

TRAITE COOPERATION EN MATIE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)Date d'expédition (jour/mois/année)
08 mars 2001 (08.03.01)Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340965/18031Demande internationale no
PCT/FR00/01972

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20 rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)
07 juillet 2000 (07.07.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

 le déposant l'inventeur le mandataire le représentant commun

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-45-00-92-02

no de télécopieur

01-45-00-46-12

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

 la personne le nom l'adresse la nationalité le domicile

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20 rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-44-29-35-00

no de télécopieur

01-44-29-35-99

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

 à l'office récepteur aux offices désignés concernés à l'administration chargée de la recherche internationale aux offices élus concernés à l'administration chargée de l'examen préliminaire international autre destinataire:Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

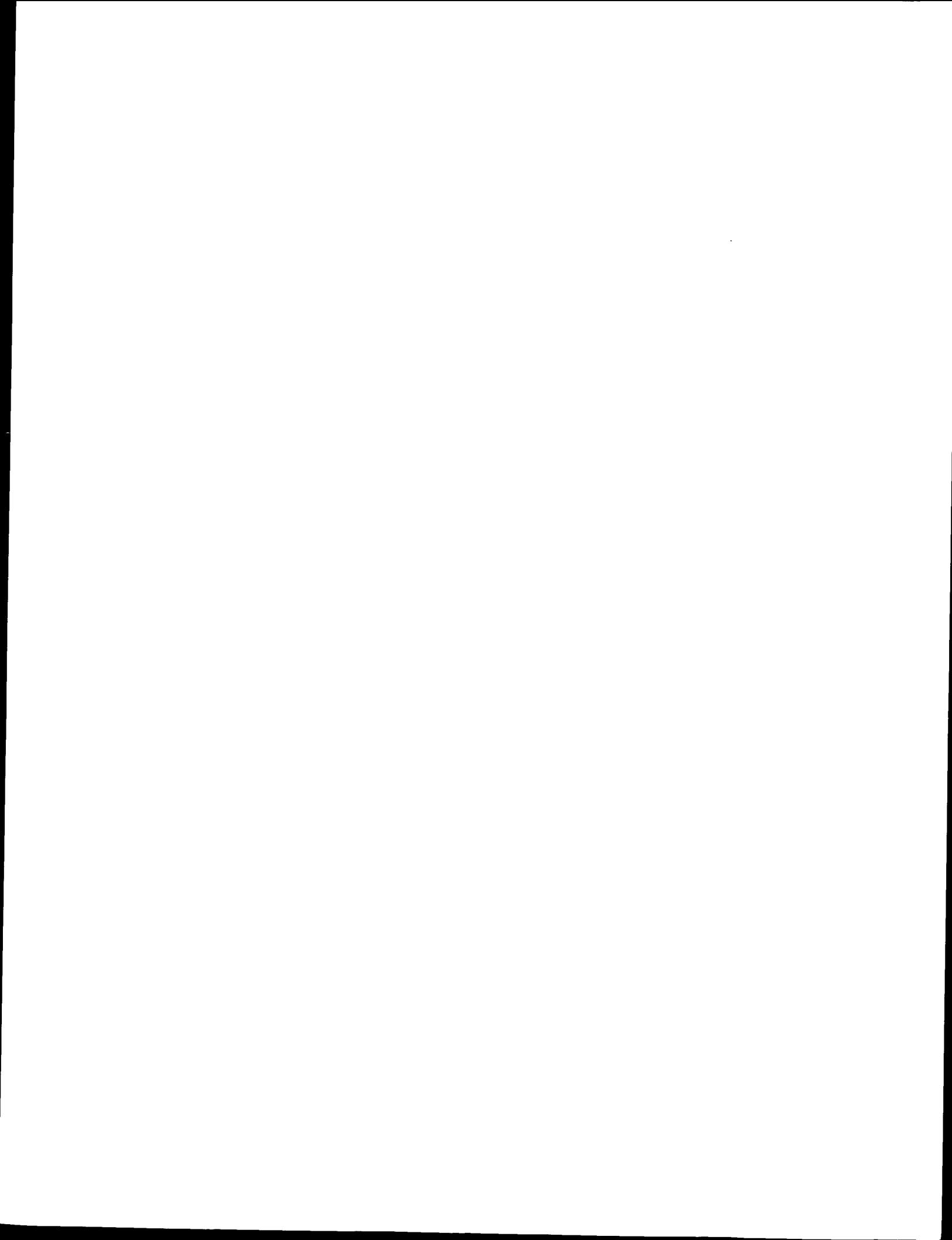
no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Ellen Moyse

no de téléphone (41-22) 338.83.38

003886616



TRAITE COOPERATION EN MATIE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 avril 2001 (04.04.01)	Destinataire: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE en sa qualité d'office élu
Demande internationale no PCT/FR00/01972 ✓	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340965/18031
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 juillet 2000 (07.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 juillet 1999 (07.07.99)
Déposant SAMAIN, Eric etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

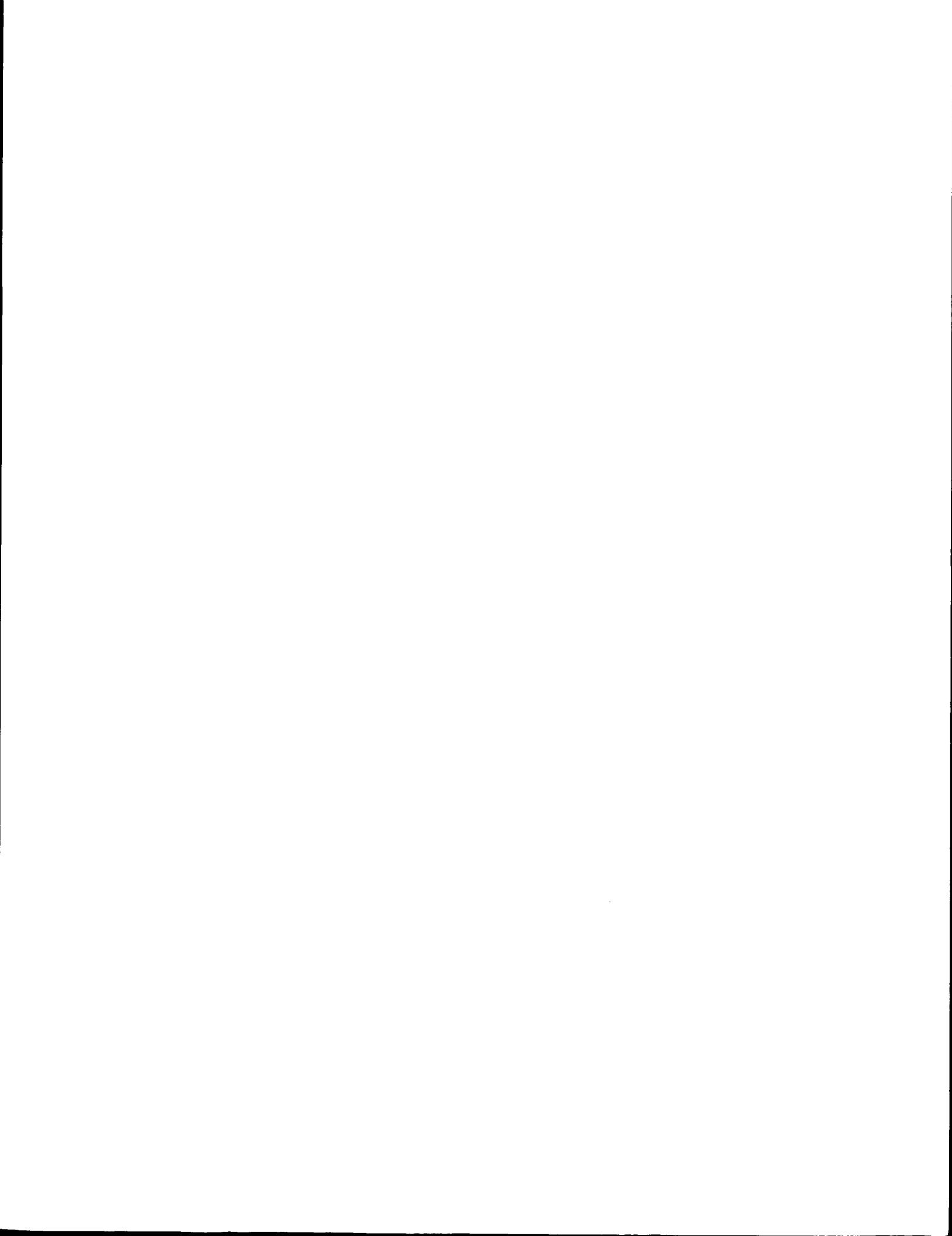
29 janvier 2001 (29.01.01)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé R. Forax no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS
PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340965/18031	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 00/01972	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 07/07/1999
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. **Base du rapport**

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

1

Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

/FR 00/01972

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P19/18 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 197 35 994 A (PIEPERSBERG WOLFGANG PROF DR) 25 février 1999 (1999-02-25) revendication 13; exemple 18 ----	1-10, 40
X	EP 0 392 556 A (MEITO SANGYO KK) 17 octobre 1990 (1990-10-17) abrégé exemples 1-4 ----	1-3, 6, 8, 14, 40
X	EP 0 315 496 A (SGN SOC GEN TECH NOUVELLE) 10 mai 1989 (1989-05-10) le document en entier ----	1, 2, 14, 40 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 novembre 2000

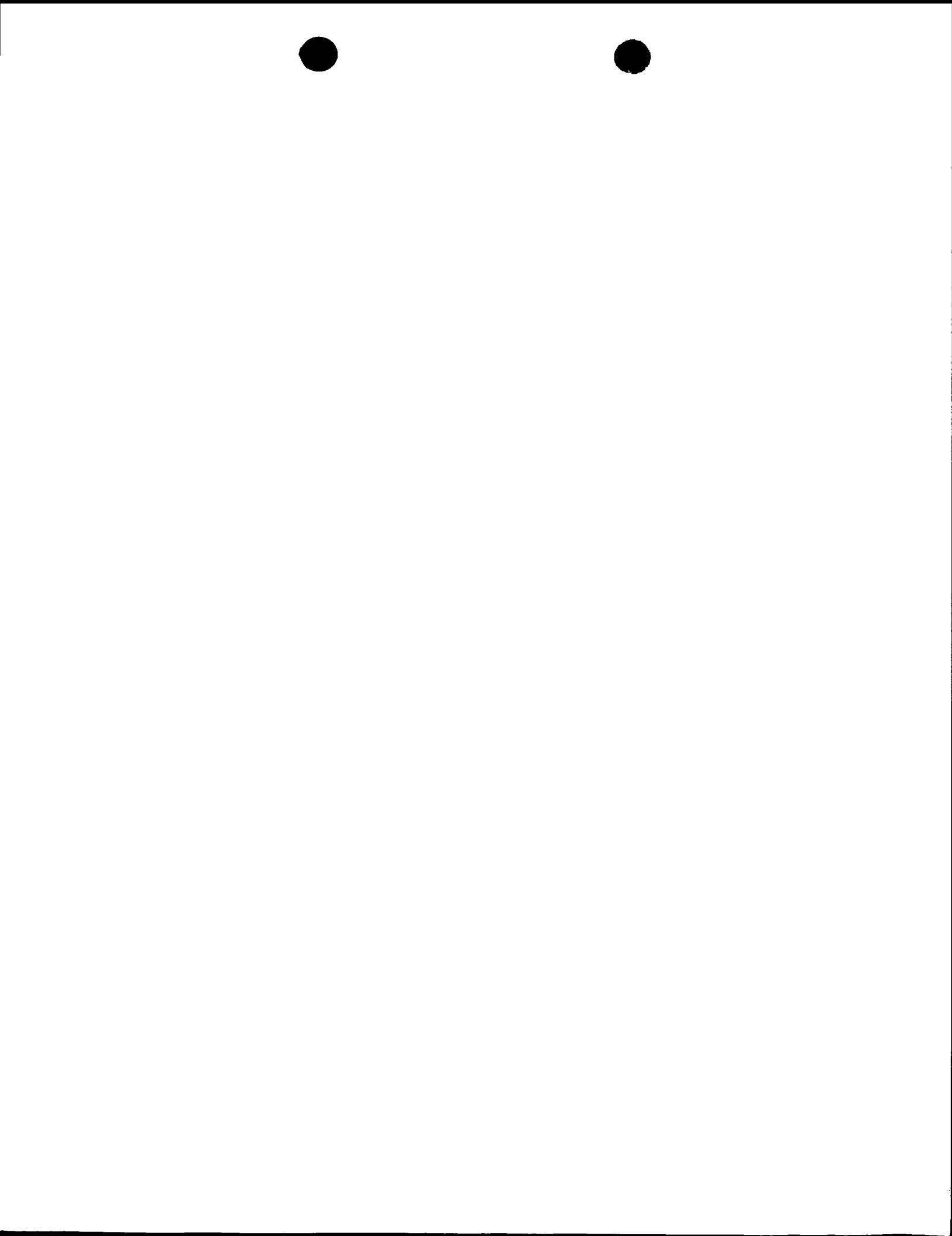
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR 00/01972

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BETTLER E ET AL: "The living factory: in vivo production of N-acetyllactosamine containing carbohydrates in <i>E. coli</i> " GLYCOCONJUGATE JOURNAL., vol. 16, mars 1999 (1999-03), pages 205-212, XP002134857 CHAPMAN & HALL., GB ISSN: 0282-0080 le document en entier ----	1-46
A	SAMAIN E ET AL: "Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant <i>Escherichia coli</i> strains harboring different combinations of nod genes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 72, no. 1-2, 11 juin 1999 (1999-06-11), pages 33-47, XP004172885 ISSN: 0168-1656 le document en entier ----	1-46
A	WO 98 44145 A (ABBOTT LAB) 8 octobre 1998 (1998-10-08) le document en entier ----	1-3
A	WO 95 02683 A (NEOSE PHARM INC) 26 janvier 1995 (1995-01-26) abrégé exemple 1 ----	1-3
A	PLUMBRIDGE JACQUELINE ET AL: "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneurameric acid by <i>Escherichia coli</i> ." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 47-54, XP000917021 ISSN: 0021-9193 cité dans la demande le document en entier -----	24,31-34

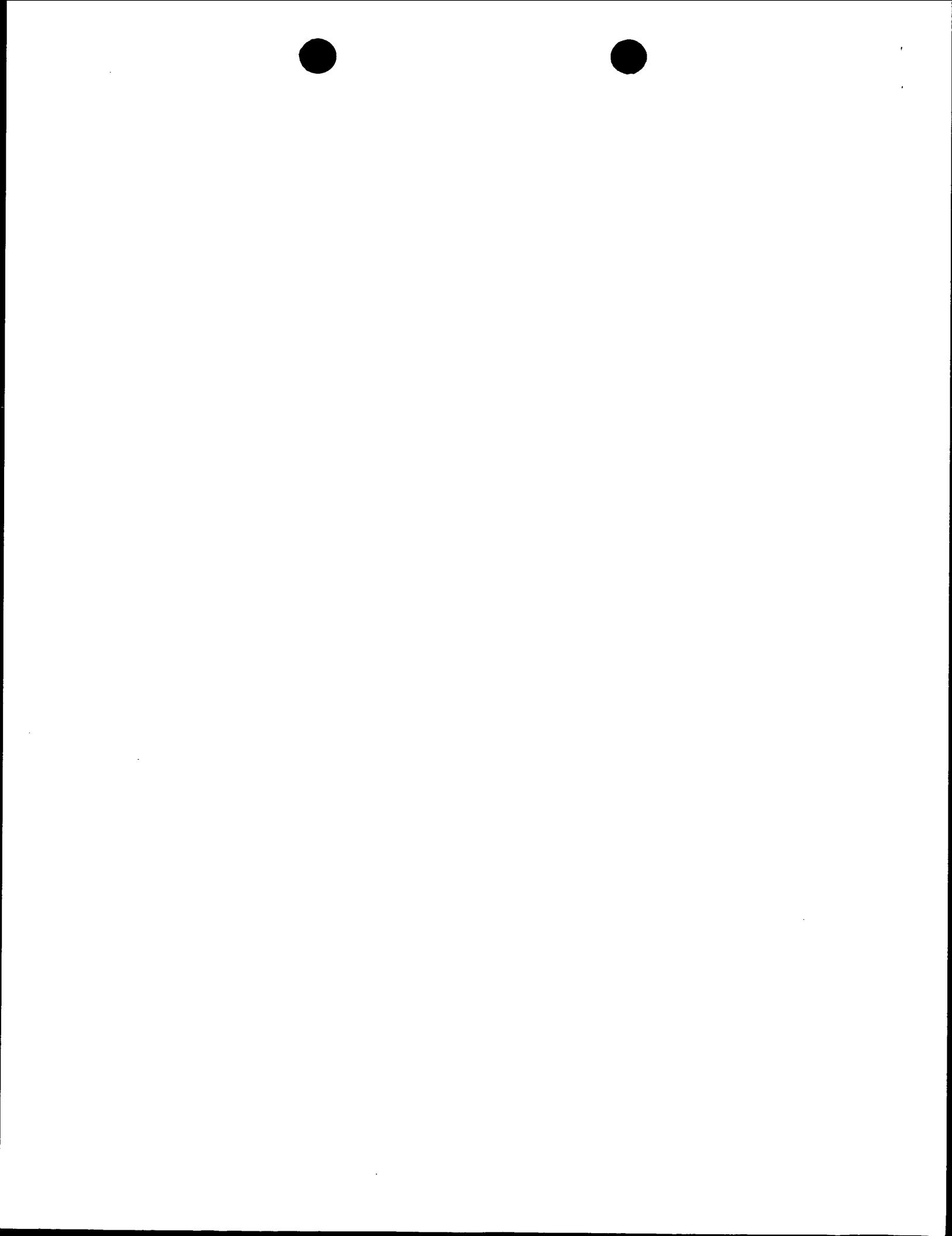
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 00/01972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19735994	A 25-02-1999	WO 9909180 A		25-02-1999
		EP 1005554 A		07-06-2000
EP 0392556	A 17-10-1990	JP 2273192 A		07-11-1990
EP 0315496	A 10-05-1989	FR 2622598 A		05-05-1989
		AT 94907 T		15-10-1993
		DE 3884342 D		28-10-1993
		DE 3884342 T		07-04-1994
		FI 883076 A		30-04-1989
		FR 2622598 B		21-06-1991
WO 9844145	A 08-10-1998	US 5945314 A		31-08-1999
		EP 0972068 A		19-01-2000
		NO 994771 A		30-09-1999
WO 9502683	A 26-01-1995	AU 691510 B		21-05-1998
		AU 7329994 A		13-02-1995
		CN 1129953 A		28-08-1996
		EP 0785988 A		30-07-1997
		FI 960173 A		15-03-1996
		JP 9503905 T		22-04-1997
		NO 960177 A		07-03-1996
		US 5879912 A		09-03-1999



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

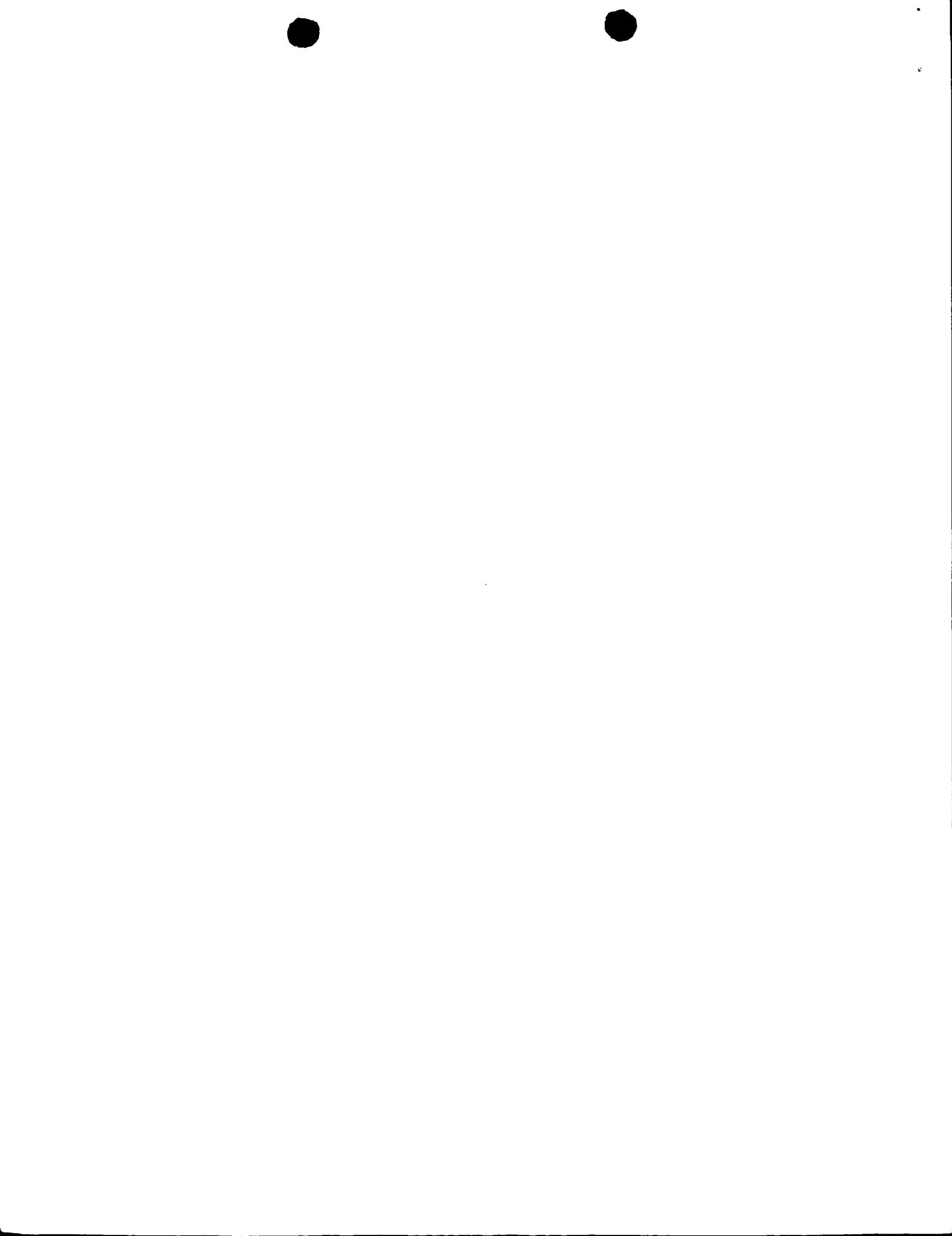
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340965/18031	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR00/01972	International filing date (day/month/year) 07 July 2000 (07.07.00)	Priority date (day/month/year) 07 July 1999 (07.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 19/18		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 January 2001 (29.01.01)	Date of completion of this report 09 October 2001 (09.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01972

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:* the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-46 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____ 1-46 _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19) _____, filed with the demand

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____ 1/9-9/9 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

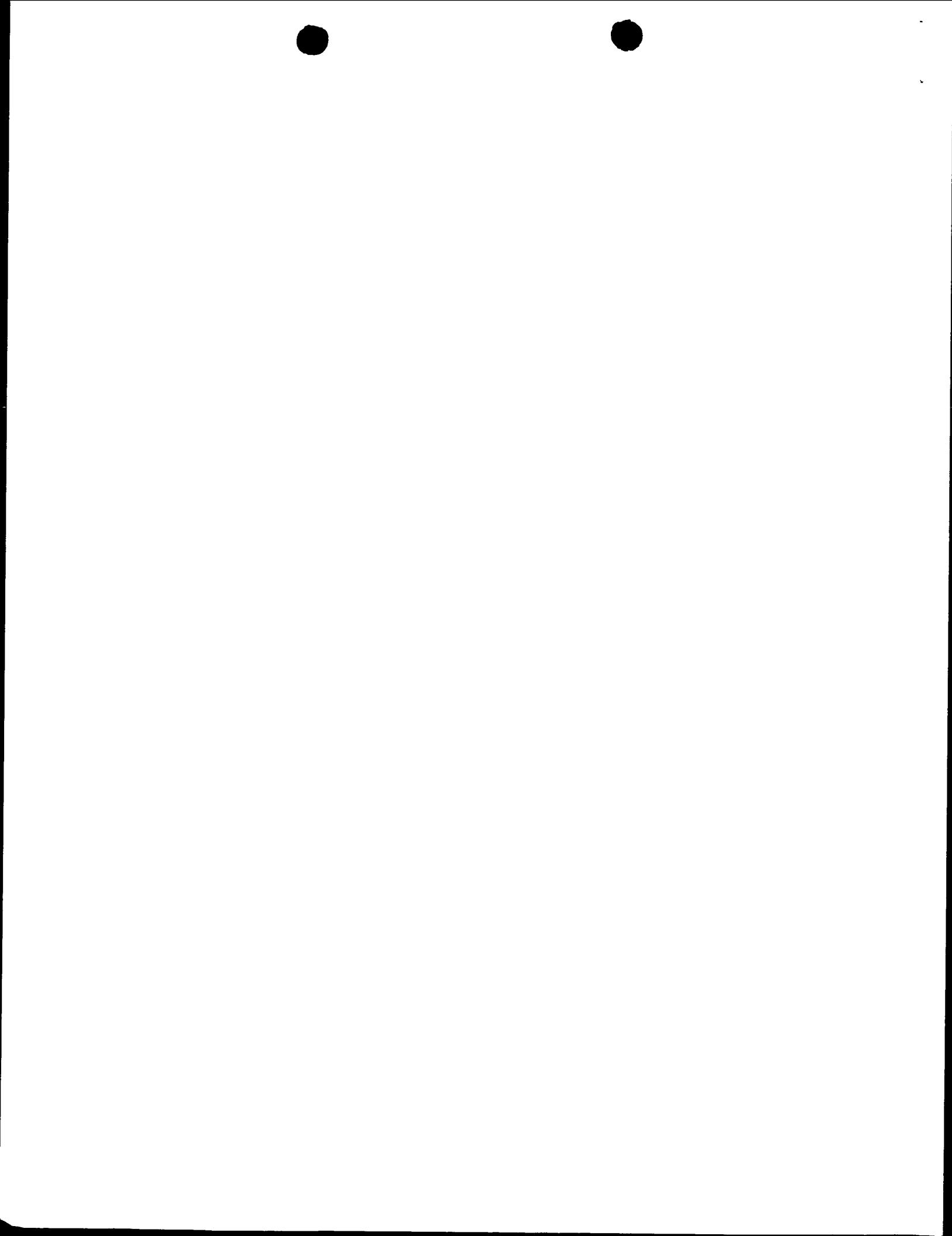
2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 00/01972**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

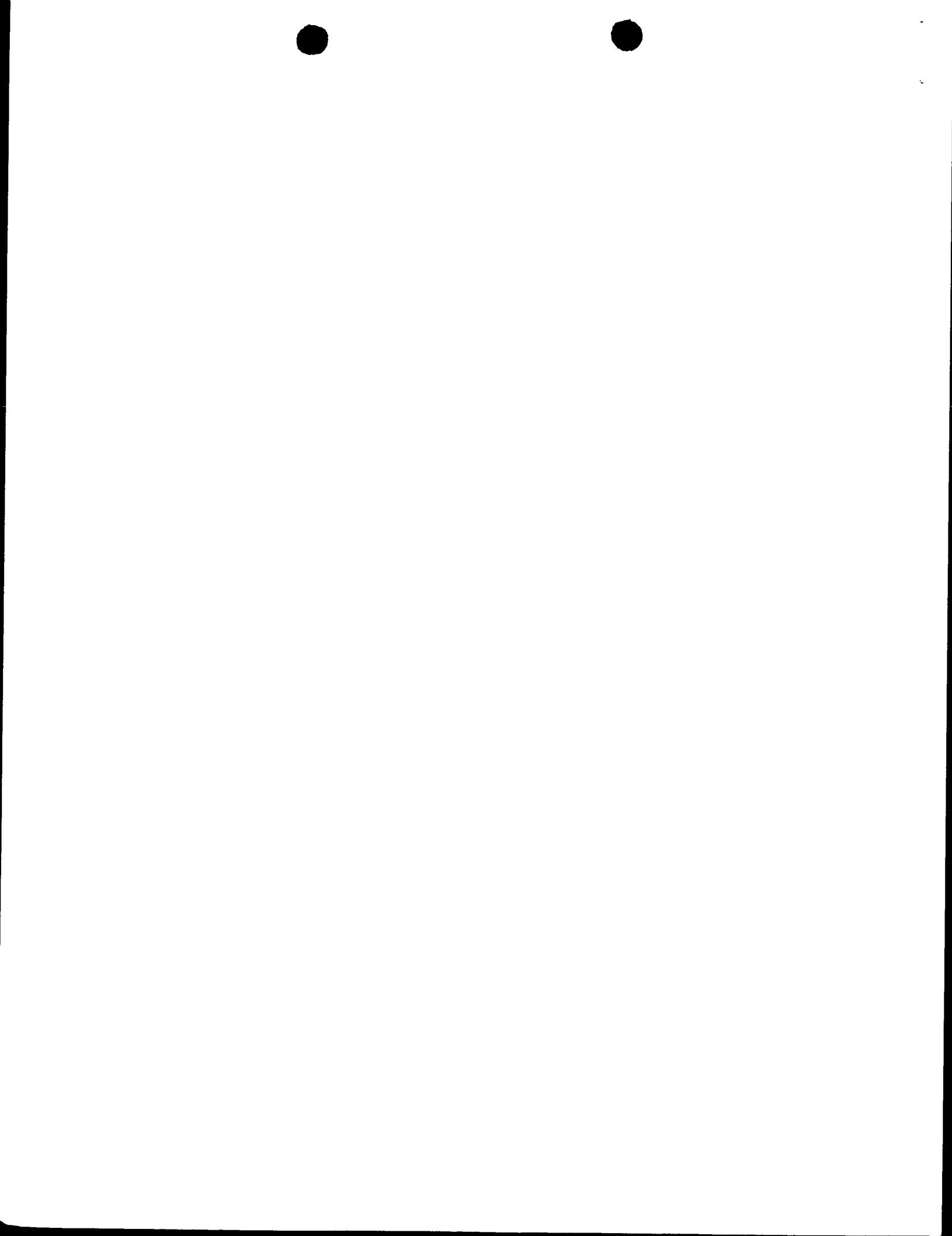
Novelty (N)	Claims	15-17, 19-26 and 28-39	YES
	Claims	1-14, 18, 27, 40-46	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-46	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-46	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. The following documents are referred to:**

D1: DE-A-197 35 994
D2: EP-A-0 392 556
D3: EP-A-0 315 496
D4: GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Vol. 16, March 1999 (1999-03), pages 205-212
D5: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Vol. 72, N° 1-2, 11 June 1999, pages 33-47
D6: WO-A-98/44145
D7: WO-A-95/02683
D8: JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 181, N° 1, January 1999, pages 47-54, cited in the application.

2. Novelty (PCT Article 33(2)):

2.1 a) D1 (page 2, lines 3-7; page 6, Example 6; page 12, Example 18; Claim 13) describes micro-organisms (*E.coli*, *Streptomyces* sp. or *Saccharomyces cerevisiae*) which express a glycosyl transferase of *Yersinia enterocolitica* capable of producing oligosaccharides by transferring activated



sugars (precursors) to β -galactosides (glycosidation); the latter can be produced by the cell or added to the culture medium (exogenous).

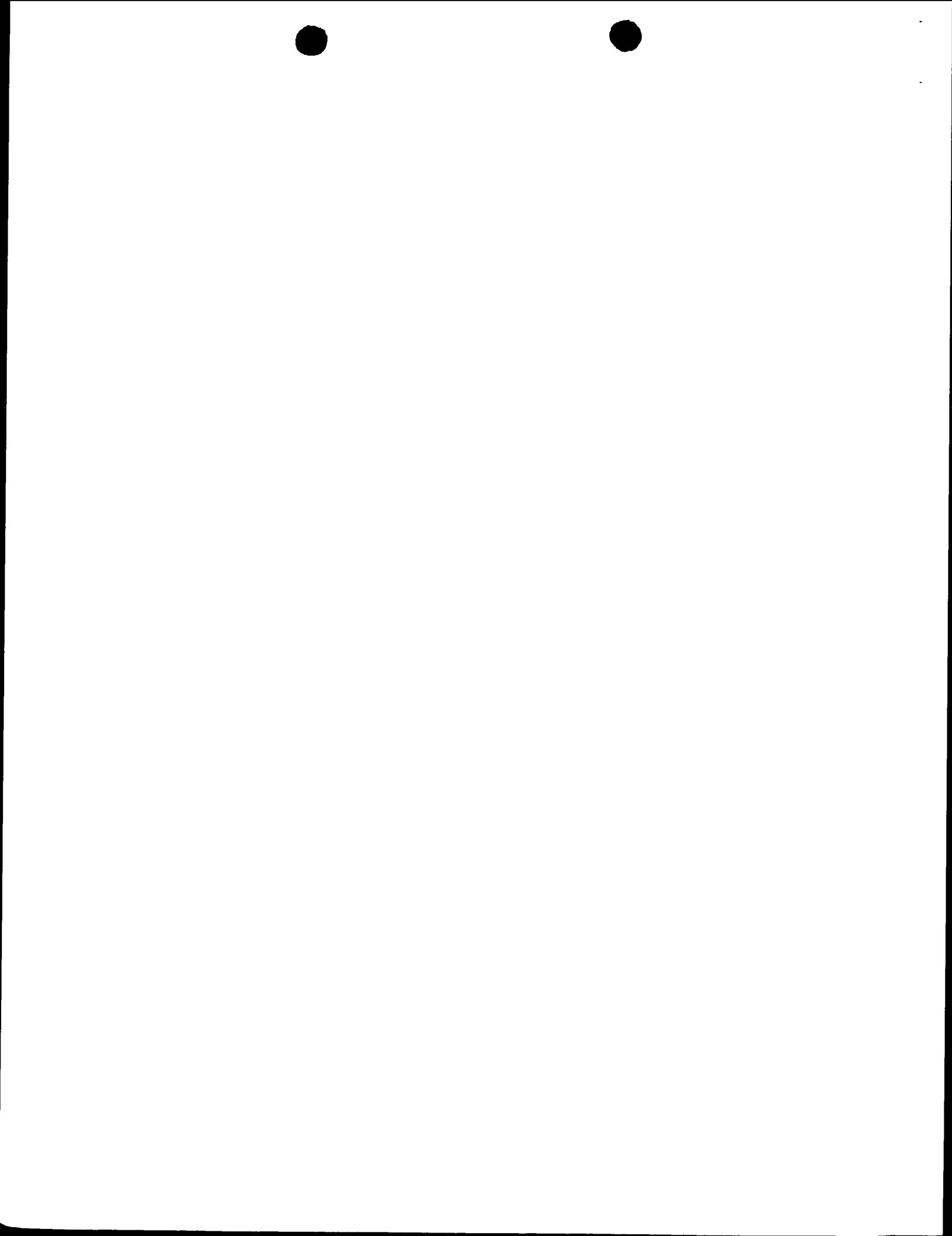
Consequently, **Claims 1-6, 8, 14 and 27** are not novel in relation to **D1** and do not meet the requirements of PCT **Article 33(2)**.

b) **D2** (abstract; examples; claims) describes a method for producing isomaltulose (reduced disaccharide) by cultivating micro-organisms of the genus *Klebsiella* (or a mutant strain) in the presence of sugar. However, this document does not mention the use of cell strains containing a recombinant gene.

D3 describes the production of oligosaccharides by cultivating *Aspergillus niger* micro-organisms. However, no genetic modification of the micro-organism is mentioned.

Consequently, neither **D2** nor **D3** affects the novelty of the subject matter of **Claims 1-39 and 45-46** of the application.

c) **D4** describes the production of oligosaccharides derived from LacNac by cultivating recombined cells of the *E.coli* type expressing glycosyl transferases such as $\alpha(1-3)$ galactosyl transferase or $\beta(1,4)$ galactosyl transferase, as well as oligosaccharide synthases from other micro-organisms (*Rhizobium*, for example). This document also describes cultures with high cell densities used in the production of these oligonucleotides and cultivated in three stages distinguished by the quantity of carbon source (glycerol) added to the medium,

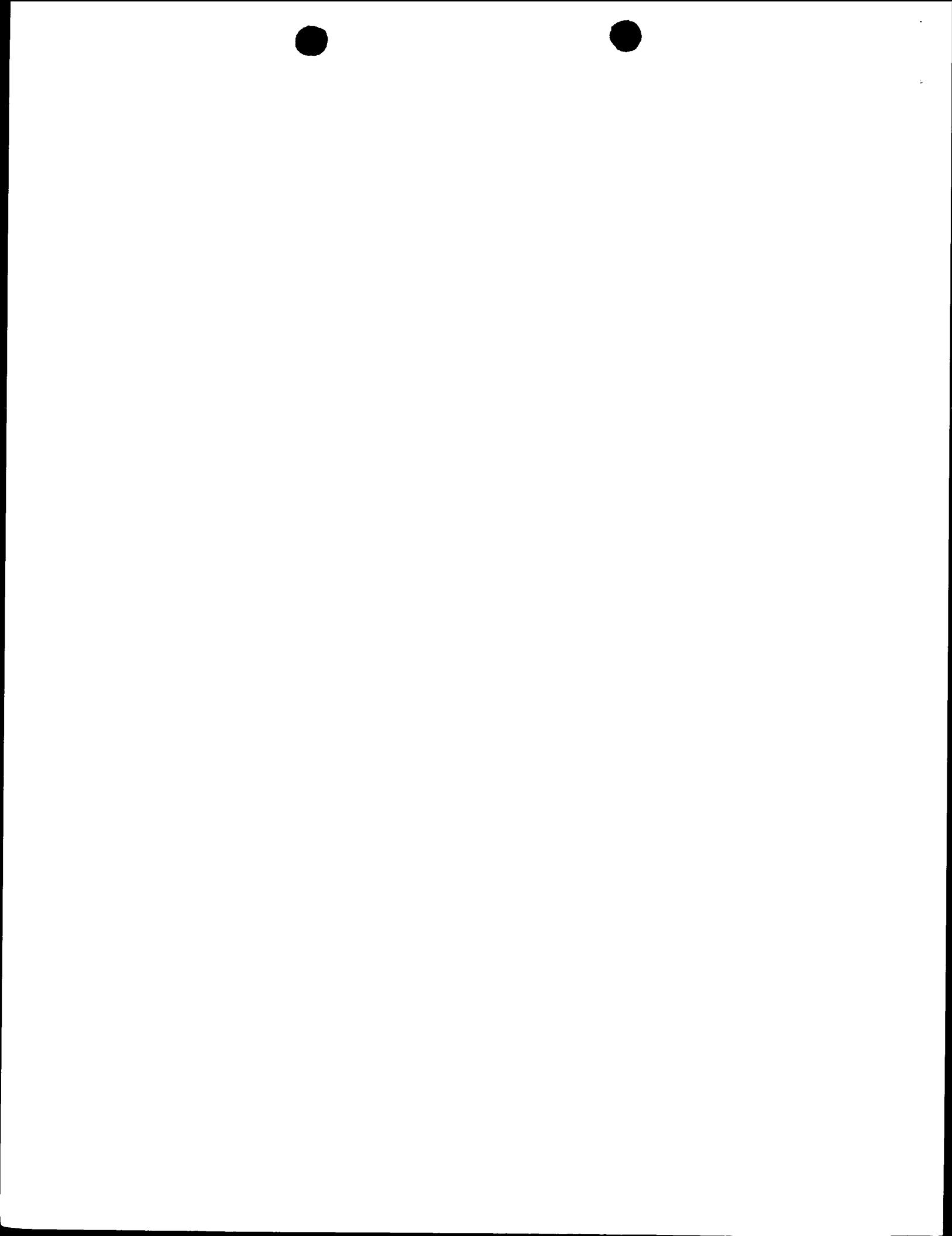


the latter being a precursor in the biosynthesis of the oligosaccharides in so far as it constitutes the carbon source for the culture medium required to produce the sugars. Consequently, **Claims 1-13** are not novel in view of the disclosure of **D4 (PCT Article 33(2))**.

d) **D5** describes the production of sulphated or acetylated chitooligosaccharides by cultivating recombinant *E.coli* strains in the presence of glycerol, used as a precursor. **Claims 1-13** of the present application are not novel in relation to **D5 (PCT Article 33(2))**.

e) **D6** describes the production of oligosaccharides by cultivating recombinant cell strains (*E.coli*, for example) expressing a glycosyl transferase and in the presence of nucleotides containing a sugar, the latter being transferred to an acceptor molecule (sugar) to form an oligosaccharide. The disclosure of **D6** deprives **Claims 1-10, 14 and 18** of novelty. Consequently, these claims do not meet the requirements of **PCT Article 33(2)**.

2.2. **Claims 40 and 41** do not meet the PCT requirements because the products covered by these claims are defined in terms of their production method. This type of drafting is only possible where the structure of the compounds for which protection is sought is not determined, i.e. where the structure cannot be identified. It should also be noted that this type of claim concerns the product, which is not rendered novel by its production method alone.



Products defined in such claims must therefore be novel and inventive. Since the compounds defined in **Claims 40 and 41** are known from the documents cited in the search report, these claims do not meet the requirements of PCT **Article 33(2)**.

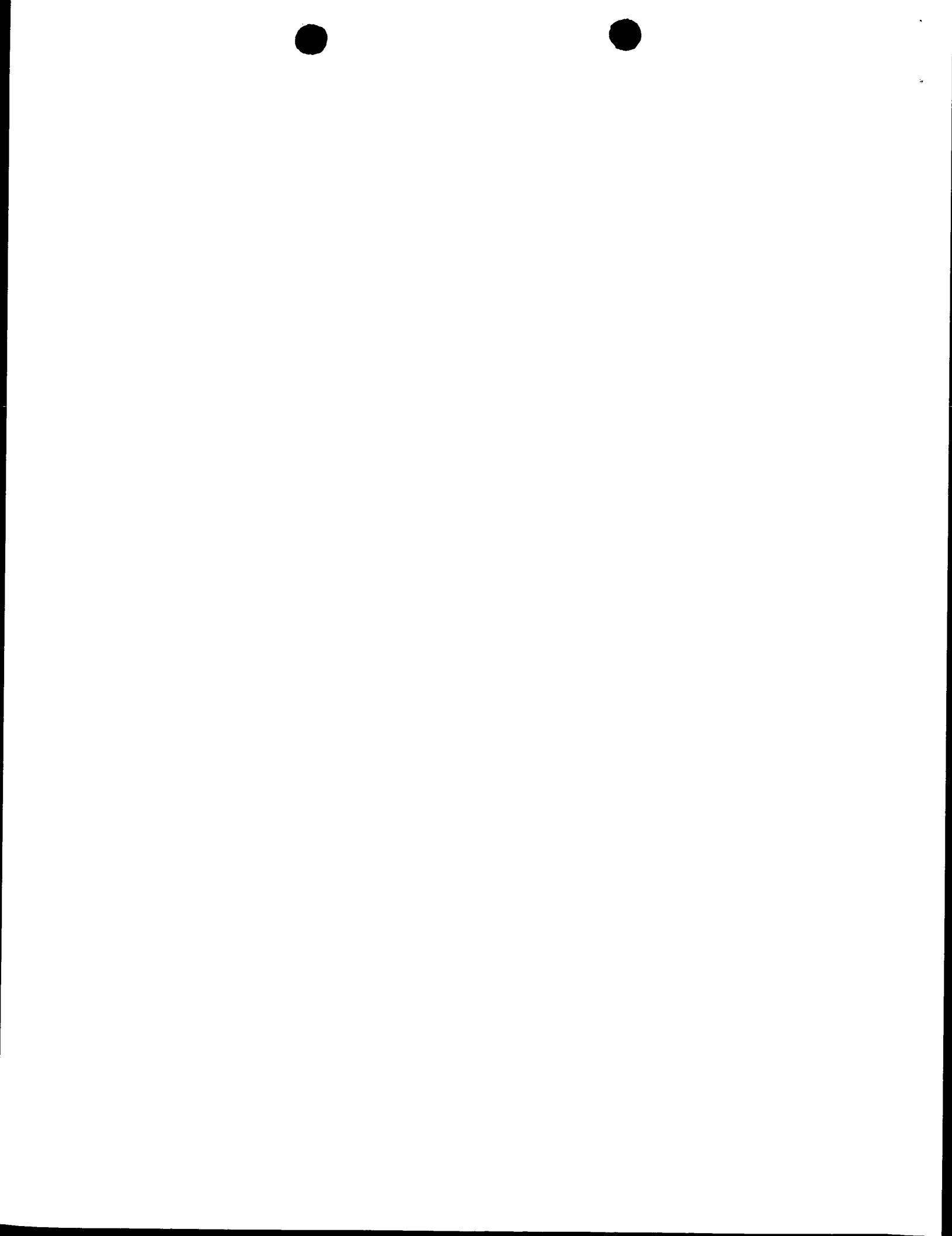
2.3 **D1** (summary), **D4** (page 205, introduction; pages 210-211, discussion), **D5** (page 5, conclusion) and **D6** (page 16, lines 17-22) describe oligosaccharides as being beneficial for plant development (fertilisers, for example), as medicines and particularly for cancer treatment and grafts, since they affect the cell adhesion of pathogenic bacteria. In the light of these documents, **Claims 42-45**, which are drafted as first and second therapeutic indications, and **Claim 46**, which concerns the use of oligosaccharides in agronomy, are not novel and do not meet the requirements of PCT **Article 33(2)**.

2.4 In summary, **Claims 1-14, 18, 27 and 40-46** are not novel in the light of **D1 and D4-D6** and they therefore fail to meet the requirements of PCT **Article 33(2)**, whereas **Claims 16-17, 19-26 and 28-39** are novel in the light of the cited documents.

3. **Inventive step (PCT Article 33(3)):**

In view of the considerable number of objections concerning the novelty of the present claims, the Examining Authority wishes to postpone giving its opinion as to the inventive step of the present application until a later stage.

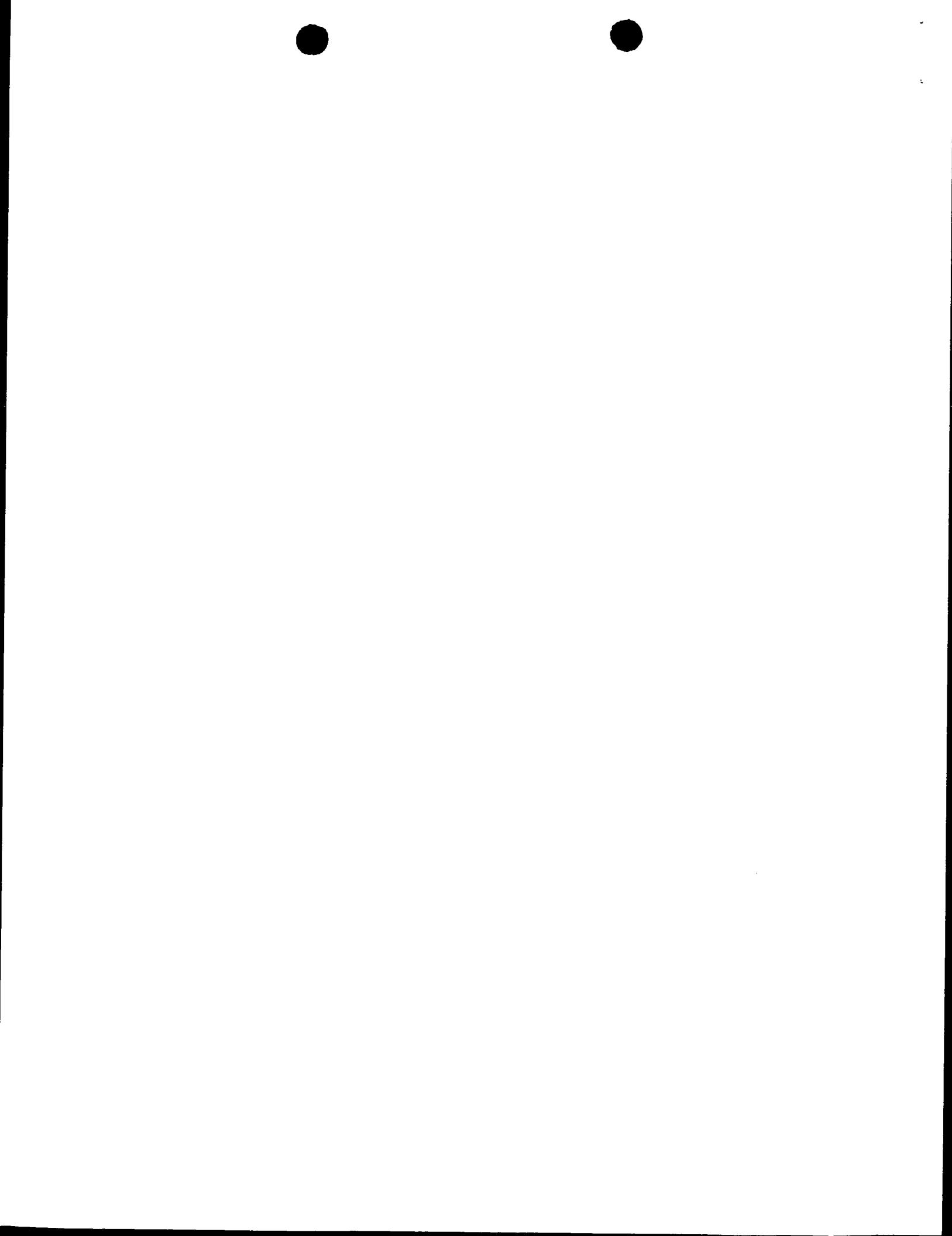
Furthermore, the applicant's attention is drawn to document **D4**, which is considered to represent the closest prior art, and which describes the use of



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01972

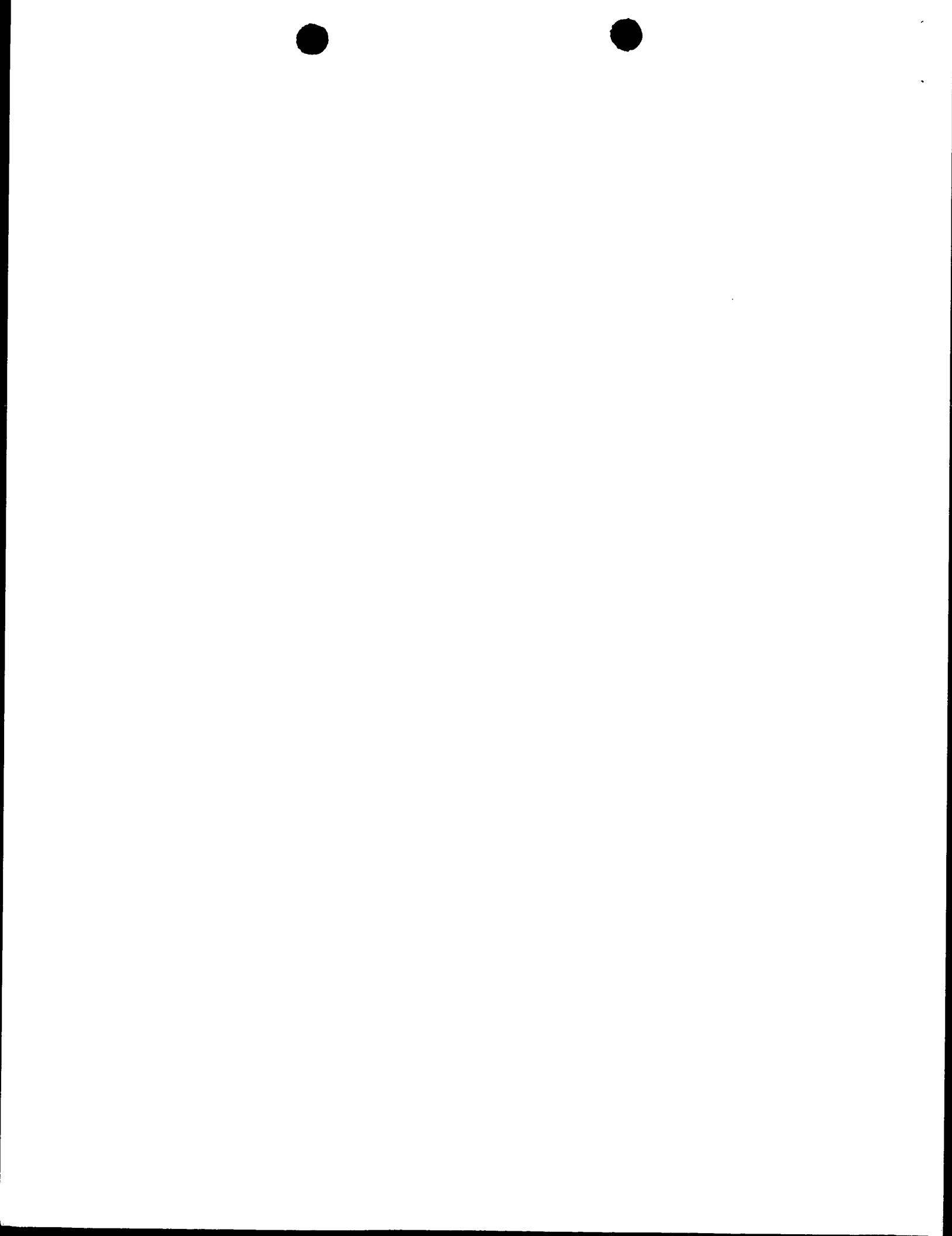
genetically modified cells in order to produce
oligosaccharides useful for therapeutic purposes.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

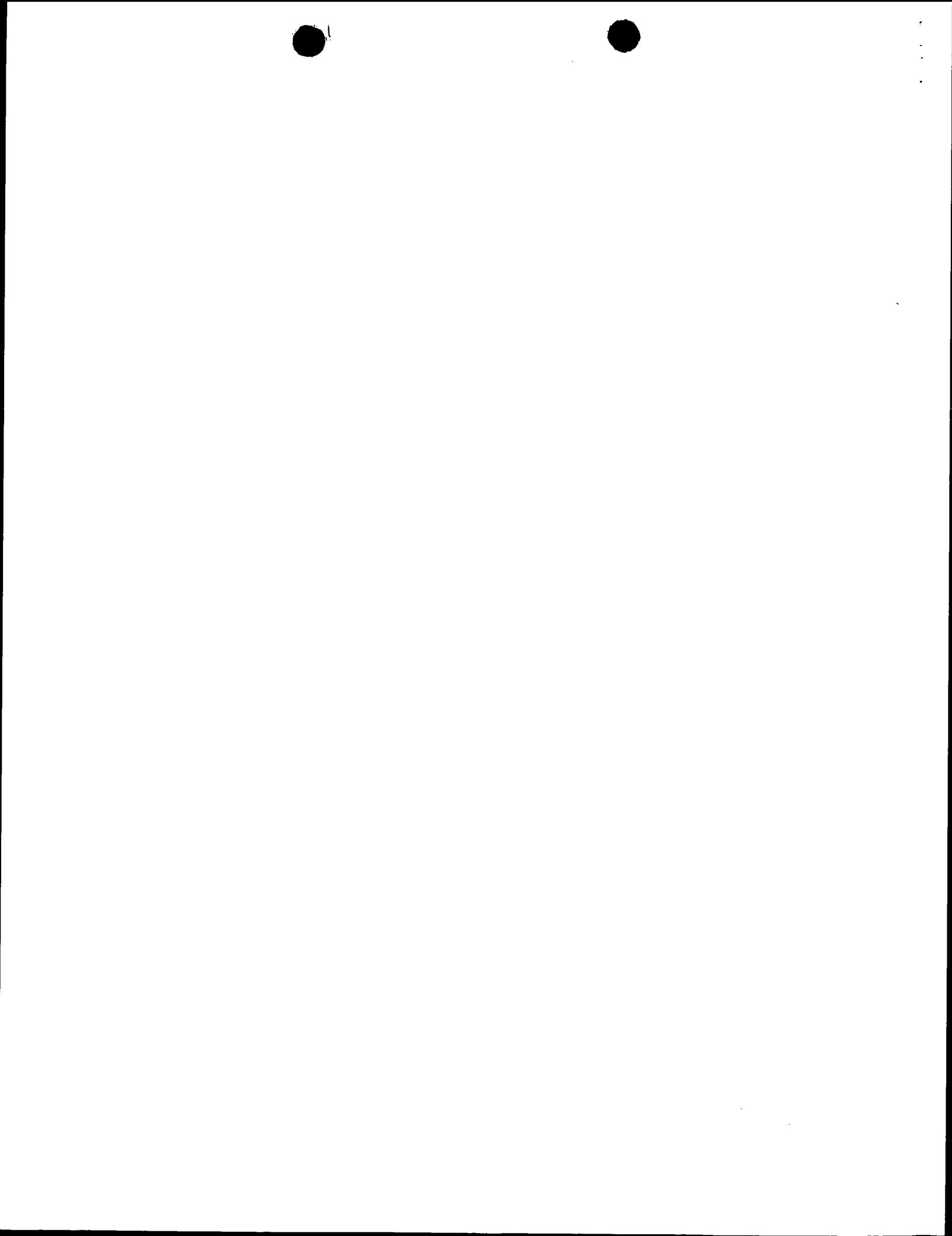
1. **Claim 10** is characterised by the object to be achieved by this claim, which is: "conditions enabling a culture with high cell density to be obtained". Since the subject matter of the claim is defined not by a functional feature but by the object to be achieved, **Claim 10** does not meet the requirements of **PCT Article 6**.



VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. On page 11 of the description, "stage b" and "phase c" of the method are referred to, but they are not mentioned in the paragraph describing the method in question (**PCT Article 5**).
2. Contrary to **PCT Rule 5.1(a)(ii)**, documents D1 and D4-D6 are neither cited nor described in the description.



PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 11 OCT 2001

INTERNATIONAL

WIPO PCT

15 T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340965/18031	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01972	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 07/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P19/18		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

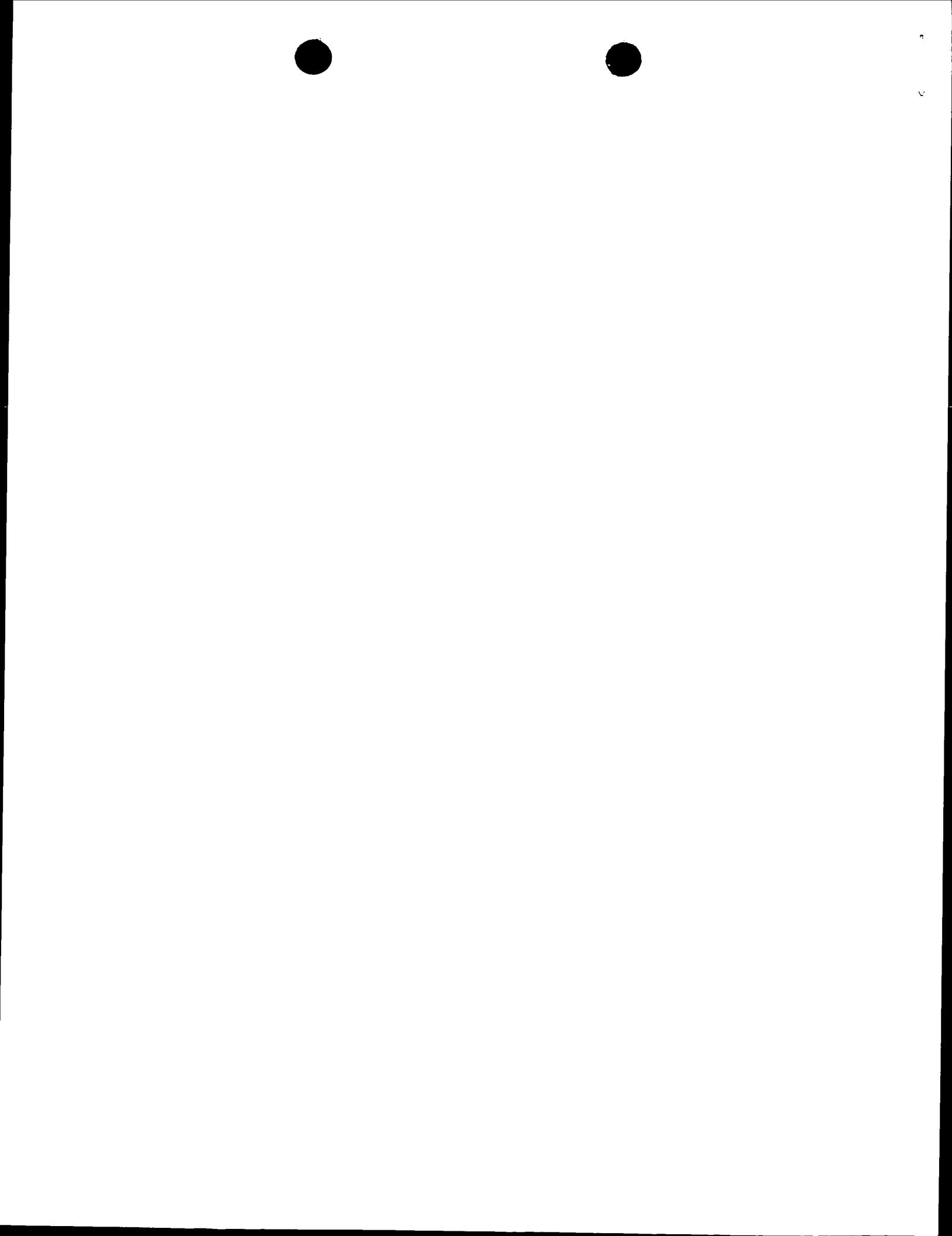
Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 09.10.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Hennard, C N° de téléphone +49 89 2399 7355





RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01972

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-46 version initiale

Revendications, N°:

1-46 version initiale

Dessins, feuilles:

1/9-9/9 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

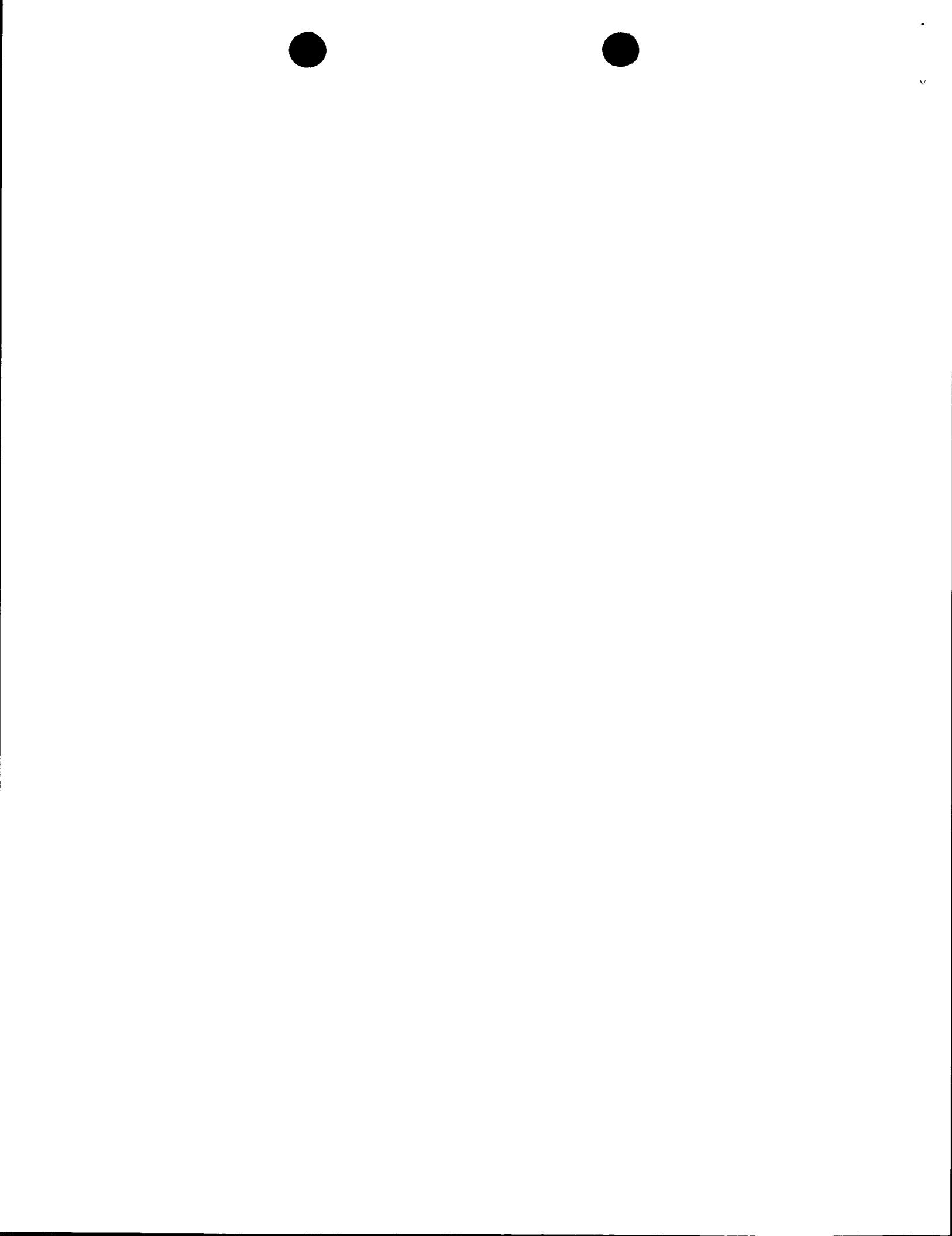
Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01972

de la description, pages : _____

des revendications, n°s : _____

des dessins, feuilles : _____

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :
(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 15-17, 19-26 et 28-39 Non : Revendications 1-14, 18, 27, 40-46
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-46
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-46 Non : Revendications

2. Citations et explications **voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants :

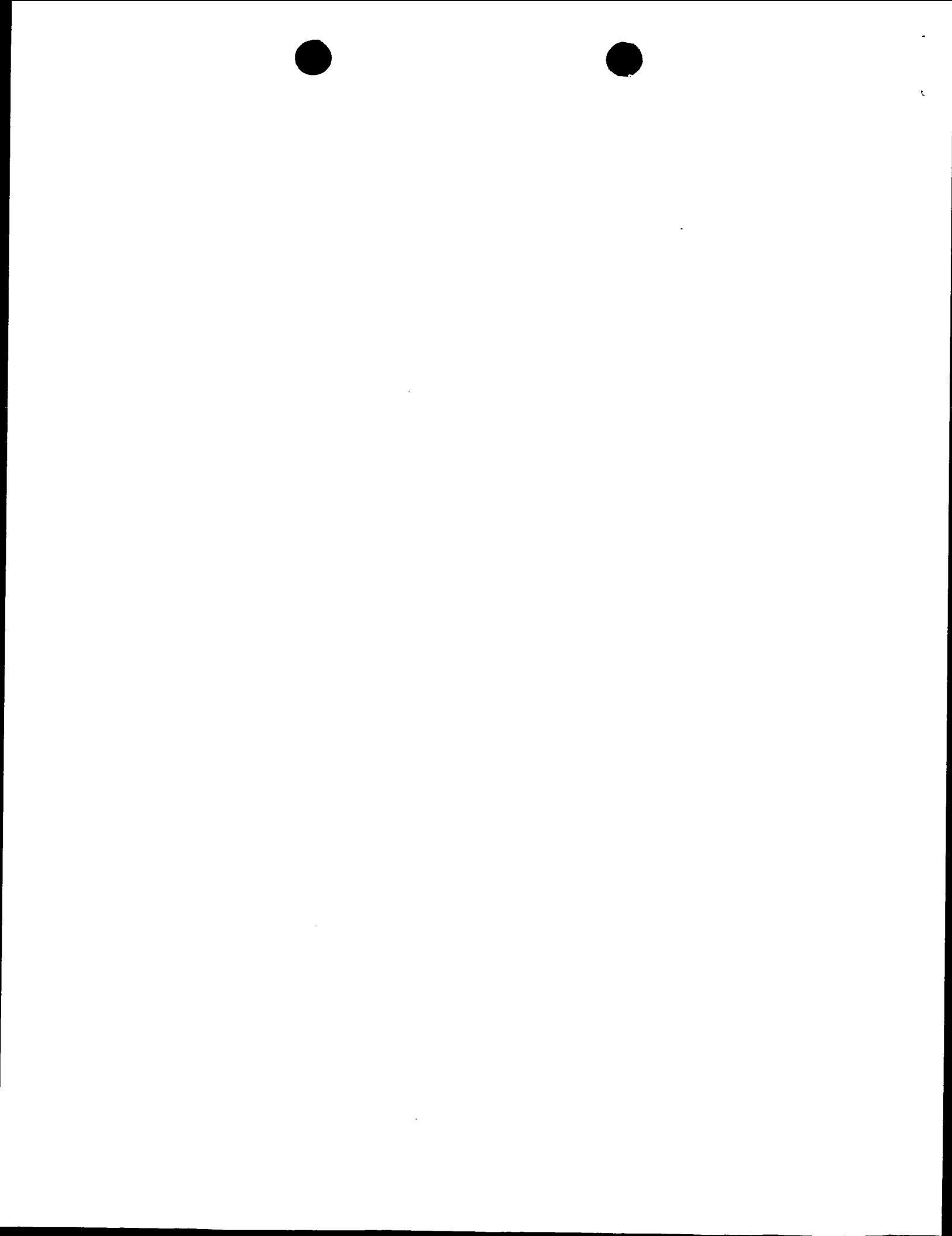
D1: DE 197 35 994 A
D2: EP-A-0 392 556
D3: EP-A-0 315 496
D4: GLYCOCONJUGATE JOURNAL., vol. 16, mars 1999 (1999-03), pages 205-212
D5: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 72, no. 1-2, 11 juin 1999, pages 33-47
D6: WO 98 44145 A
D7: WO 95 02683 A
D8: JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 1, janvier 1999, pages 47-54, cité dans la demande

2. **Nouveauté (Article 33(2) PCT) :**

2.1 a) **D1** (page 2, lignes 3-7 ; page 6, exemple 6 ; page 12, exemple 18 ; revendication 13) décrit des microorganismes (*E.coli*, *Streptomyces* sp. ou *Saccharomyces cerevisiae*) exprimant une glycosyltransférase de *Yersinia enterocolitica* capable de produire des oligosaccharides en transférant des sucres activés (précurseurs) sur des β -galactosides (glycosidation), ces derniers pouvant être produits par la cellule ou apportés dans le milieu de culture (exogène).

De ce fait, les **revendications 1-6, 8, 14 et 27** ne sont pas nouvelles au regard de **D1** et ne remplissent pas les conditions de l'**Article 33(2)** du PCT.

b) **D2** (abrégé ; exemples ; revendications) décrit un procédé de préparation d'isomaltulose (disaccharide réduit) en cultivant des microorganismes appartenant au genre *Klebsiella* (ou une souche mutée) en présence de sucre. Toutefois ce document ne mentionne pas l'utilisation de souches de cellules comprenant un gène recombinant.



D3 décrit la production d'oligosaccharides par culture de microorganismes *Aspergillus niger*. Toutefois aucune modification génétique du microorganisme n'est évoquée.

De ce fait, ni D2, ni D3 n'affectent la nouveauté de l'objet de la demande selon les **revendications 1-39 et 45-46**.

- c) D4 décrit la production d'oligosaccharides dérivés de LacNac en cultivant des cellules de type *E.coli* recombinées, exprimant des glycosyltransférases comme l' α (1-3) galactosyltransférase ou la β (1,4) galactosyltransférase, ainsi que des oligosaccharides synthases provenant d'autres microorganismes (*Rhizobium* par exemple). De plus ce document décrit des cultures de haute densité cellulaire utilisées lors de la préparation de ces oligonucléotides, et cultivées en trois phases distinctes par la quantité de source de carbone (glycérol) ajouté dans le milieu, ce dernier étant un précurseur dans la biosynthèse des oligosaccharides dans la mesure où il représente la source de carbone du milieu de culture nécessaire à la préparation des sucres. De ce fait, les **revendications 1-13** ne sont pas nouvelles à la vue des informations données dans D4 (**Article 33(2) PCT**).
- d) D5 décrit la production de chitoooligosaccharides acétylés ou sulfatés en cultivant des souches d'*E.coli* recombinantes en présence de glycérol, utilisé comme précurseur. Les **revendications 1-13** de la présente demande ne sont pas nouvelles à la vue de D5 (**Article 33(2) PCT**).
- e) D6 décrit la production d'oligosaccharides en cultivant des souches cellulaires recombinantes (*E.coli* par exemple) exprimant une glycosyltransférase et en présence de nucléotides portant un sucre, ce dernier étant transféré sur une molécule acceptrice (sucre) en vue de former un oligosaccharide. Les éléments décrits dans D6 rendent les **revendications 1-10, 14 et 18** non nouvelles. De ce fait, ces revendications ne remplissent pas les conditions de l'**Article 33(2)** du PCT.

2.2 Les **revendications 40 et 41** ne remplissent pas les conditions du PCT car les produits faisant l'objet de ces revendications sont définis par leur procédé d'obtention. Ce type de formulation n'est possible que si la structure des composés pour lesquels la protection est souhaité n'est pas déterminée, c'est-à-dire que la structure ne peut être identifiée. De plus il est rappelé que ce type



de revendications porte sur le produit qui ne devient pas nouveau du seul fait du procédé de préparation de celui-ci. Les produits faisant l'objet d'une telle revendications doivent par conséquents être nouveaux et présenter un caractère inventif. Comme les composés faisant l'objet des **revendication 40 et 41** sont connus des documents cités dans le rapport de recherche, ces revendications ne remplissent pas le conditions de l'**Article 33(2)** du PCT.

2.3 **D1** (résumé), **D4** (page 205, introduction ; page 210-211, discussion), **D5** (page 5, conclusion) et **D6** (page 16, lignes 17-22) décrivent les oligosaccharides comme présentant un intérêt dans le développement de plantes (engrais par exemple) et comme médicaments et plus particulièrement dans le traitement de cancer, de greffes et interviennent dans l'adhésion cellulaire de bactéries pathogènes. A la vue de ces documents, les **revendications 42-45** qui ont une formulation de première et seconde indication thérapeutique, ainsi que la **revendication 46** qui porte sur l'utilisation d'oligosaccharides dans l'agronomie ne sont pas nouvelles et ne remplissent pas les conditions de l'**Article 33(2)** du PCT.

2.4 En résumé, les **revendications 1-14, 18, 27 et 40-46** ne sont pas nouvelles au regard de **D1, D4-D6** et de ce fait ne remplissent pas les conditions requises par l'**Article 33(2)** du PCT tandis que les **revendications 16-17, 19-26 et 28-39** sont nouvelles au regard des documents cités.

3. Activité inventive (Article 33(3) PCT) :

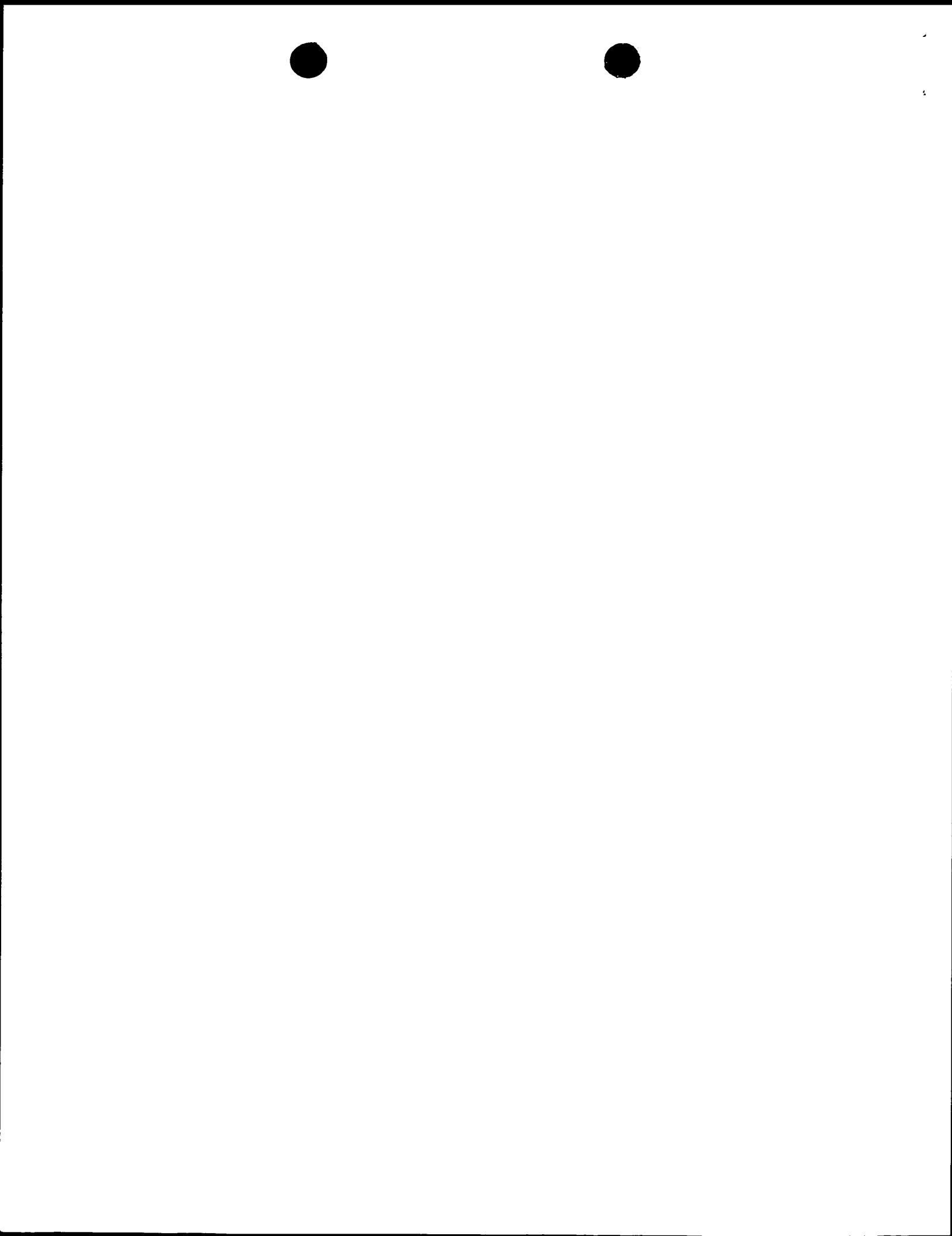
Vu le nombre important d'objections portant sur la nouveauté des revendications de la demande, l'IPEA souhaite réserver la formulation d'une opinion concernant l'activité inventive de la demande à une phase ultérieure.

De plus, l'attention de la Demanderesse est attiré sur le document **D4**, qui est considéré comme l'art antérieur le plus proche, et qui décrit l'utilisation de cellules génétiquement modifiées afin de produire des oligosaccharides présentant un intérêt thérapeutique.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. **La revendication 10** est caractérisée par le but à atteindre de cette revendication



qui est : "des conditions permettant l'obtention d'une culture à haute densité cellulaire". L'objet de la revendication n'étant pas défini par une caractéristique fonctionnelle, mais par son but à atteindre, la **revendication 10** ne remplit pas les conditions de l'**Article 6 du PCT**.

Concernant le point VII**Irrégularités dans la demande internationale**

1. A la page 11 de la description, il est fait allusion à "l'étape b" et à "la phase c" du procédé, celles-ci n'étant pas mentionnées dans le paragraphe décrivant le procédé en question (**Article 5 du PCT**).

2. Les documents **D1** et **D4-D6** ne sont ni cités ni décrits dans la description comme le voudrait la **Règle 5.1(a)(ii)** du PCT.

« PROCEDE DE PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES ».

La présente invention a pour objet la production par voie microbiologique d'oligosaccharides d'intérêt biologique.

5 Il est maintenant bien établi que les oligosaccharides jouent un rôle biologique important notamment au niveau de l'activité et de la fonction des protéines ; ils servent ainsi à moduler la durée de la demi-vie des protéines, parfois ils interviennent dans la structure de la protéine. Les oligosaccharides jouent un rôle critique dans la 10 variabilité antigénique (groupe sanguin par exemple), et dans certaines infections bactériennes telles celles provoquées par *Neisseria meningitidis*.

15 Comme les oligosaccharides sont habituellement obtenus avec un faible rendement par purification à partir de sources naturelles, la synthèse d'oligosaccharides est devenue un challenge majeur de la chimie des carbohydrates, afin de fournir des 20 quantités suffisantes d'oligosaccharides bien caractérisés, nécessaires à la recherche fondamentale ou pour toutes autres applications potentielles (Boons *et al.*, 1996).

20 La synthèse d'oligosaccharides complexes d'intérêt biologique peut être réalisée par voie chimique, enzymatique ou microbiologique.

25 Malgré le développement de nouvelles méthodes chimiques de synthèse d'oligosaccharides au cours de ces 20 dernières années, la synthèse chimique d'oligosaccharides reste très difficile en raison des nombreuses étapes de protections et de déprotections sélectives, de la labilité des liaisons glycosidiques, des difficultés à obtenir des couplages régiospécifiques et des faibles rendements de production. Comme le nombre des étapes augmente avec la taille de

l'oligosaccharide, la préparation de larges quantités d'oligosaccharides plus longs que les trisaccharides n'est pas aisée. Contrairement à l'expérience de la synthèse peptidique ou de la synthèse nucléique, la chimie organique synthétique traditionnelle 5 ne peut donc fournir aujourd'hui une synthèse de qualité et en quantité d'oligosaccharides même de formule simple.

Conséquemment, les méthodes enzymatiques sont devenues plus populaires car elles permettent une synthèse régiosélective dans des conditions douces et sans étape de protection des groupes 10 hydroxyles. Le développement de l'approche enzymatique a été rendu possible par le clonage et l'identification fonctionnelle de nombreux gènes codant pour les enzymes intervenant dans la voie de synthèse des oligosaccharides. Ainsi, différents types d'enzymes peuvent être utilisés pour la synthèse *in vitro* d'oligosaccharides. La 15 fonction physiologique des glycosyl-hydrosylases et des glycosyl-phosphorylases est de dépolymériser les oligosaccharides mais elles peuvent également être utilisées *in vitro* dans la synthèse des oligosaccharides en contrôlant l'équilibre et la cinétique de la réaction. Les substrats des enzymes de ces réactions sont aisément 20 disponibles mais ces réactions enzymatiques ne sont pas très versatiles. Une autre méthode enzymatique développée utilise les glycosyl-transférases de la voie biochimique Leloir qui présentent une forte régiospécificité pour le précurseur ainsi que pour le substrat donneur ; ces glycosyl-transférases ne sont pas aussi 25 aisément disponibles que les glycosyl-hydrolases. La technique de l'ADN recombinant, à récemment permis de cloner et de produire un certain nombre d'entre elles. Cependant, la principale limitation de cette méthode enzymatique réside dans le coût très élevé des

nucléotides-sucres qui sont les donneurs de sucre utilisé par ces enzymes.

La voie microbiologique de production d'oligosaccharides recombinants *in vivo* est la plus séduisante des voies de synthèse puisque la bactérie se charge à la fois de la biosynthèse des enzymes, de la régénération des nucléotides-sucres et finalement de la production de l'oligosaccharide.

Les premières descriptions de la synthèse d'oligosaccharides par la voie microbiologique utilisant des bactéries recombinantes peuvent être considérées dans une certaine mesure comme les travaux qui ont conduit à l'élucidation des voies de biosynthèse des facteurs de nodulation ; ces facteurs sont des molécules signal sécrétées par les rhizobia pour permettre la reconnaissance par les légumineuses dans le processus de nodulation. Les facteurs de nodulation sont constitués d'un squelette chitooligosaccharidique portant différentes substitutions. L'identification fonctionnelle des gènes *nod* impliqués dans la biosynthèse des facteurs de nodulation a été en partie réalisée en identifiant les oligosaccharides formés *in vivo* dans des souches d'*Escherichia coli* exprimant ces différents gènes *nod* (Gérémia *et al*, 1994 ; Kamst *et al*, 1995 ; Spaink *et al*, 1994 ; Mergaert *et al*, 1995). Cependant, la production d'oligosaccharides en elle-même n'était pas le but de ces études ; ces produits n'ont été synthétisés qu'à l'état de trace et ne furent identifiés que grâce à l'utilisation de précurseurs radioactifs.

En revanche, il a été récemment démontré dans notre laboratoire (Samain *et al*, 1997) que la culture à haute densité cellulaire de souches d'*Escherichia coli* possédant le gène *nodC* (chitooligosaccharide synthase) permettait de produire des

quantités importantes supérieures à 2 g/l de chitooligosaccharides dits recombinants.

Cette technique de synthèse microbiologique d'oligosaccharides reste cependant limitée à la production des seuls 5 chitooligosaccharides, du fait de la propriété unique de nodC (chitooligosaccharide synthase) de fonctionner sans précurseur, les autres enzymes glycosylent en effet un précurseur spécifique et leur activité est donc dépendante de la présence de ce précurseur dans la cellule. Le problème du précurseur est donc le principal verrou 10 qui bloque le développement de la méthode et de son extension à la production d'autres types d'oligosaccharides.

La présente invention a donc pour objet un procédé de production d'un oligosaccharide d'intérêt par une cellule génétiquement modifiée à partir d'au moins un précurseur exogène 15 internalisé par ladite cellule, ledit précurseur intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit procédé comprenant les étapes (i) d'obtention d'une cellule qui comprend au moins un gène recombinant codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification dudit précurseur exogène ou de l'un 20 des intermédiaires de la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur exogène nécessaire à la synthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ladite cellule étant dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader 25 ledit oligosaccharide, ledit précurseur et lesdits intermédiaires ; (ii) de mise en culture de ladite cellule en présence d'au moins undit précurseur exogène, dans des conditions permettant l'internalisation selon un mécanisme de transport passif et/ou actif

dudit précurseur exogène par ladite cellule et la production dudit oligosaccharide par ladite cellule.

Selon un mode particulier de réalisation, la présente invention concerne un procédé tel que décrit ci-dessus caractérisé en ce que ladite cellule comprend en outre au moins un gène codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification d'un précurseur endogène intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit enzyme étant identique ou différent de l'enzyme utilisé dans le procédé décrit ci-dessus, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule et caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur.

On entend désigner par oligosaccharides, des polymères linéaires ou ramifiés au nombre variable de résidus, de liaisons et de sous-unités ; le nombre de résidus étant supérieur à 1. Les oligosaccharides sont des glucides qui se transforment à l'hydrolyse en plusieurs molécules de monosaccharides ; les monosaccharides étant les sucres qu'on ne peut transformer par hydrolyse en substance plus simple. On subdivise les monosaccharides en trioses, tetroses, pentoses, hexoses, heptoses selon le nombre d'atomes de carbone de leur chaîne hydrocarbonée et aussi en aldoses et cétoles selon la présence d'une fonction aldéhydique ou d'une fonction cétone dans leur molécule. Parmi les monosaccharides les plus fréquents, on peut citer le mannose, le glucose, le galactose, le N-acétyl-glucosamine, le N-acétyl-galactosamine. Le nombre de chaînes d'oligosaccharides stéréoisomères est extrêmement large, du au nombre important de carbones asymétriques dans la chaîne hydro-carbonée.

Par précurseur exogène, on entend désigner un composé intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide selon l'invention qui est internalisé par ladite cellule. Par précurseur endogène, on entend désigner un composé intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide selon l'invention qui est naturellement présent dans ladite cellule.

Par cellule génétiquement modifiée, on entend désigner un microorganisme dans lequel au moins une altération de la séquence d'ADN a été introduite dans son génome afin de conférer un phénotype particulier à ladite cellule. De telles altérations peuvent ainsi conférer par exemple l'aptitude de la cellule à ne pas dégrader ou à ne pas modifier un composé selon l'invention ou à ne pas diminuer la fréquence de réarrangement de l'ADN.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule choisie parmi les bactéries et les levures. Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, la bactérie est choisie parmi le groupe composé de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Thermophilus aquaticus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la bactérie est *Escherichia coli*. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule est une levure qui est de préférence *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*. La cellule selon l'invention est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit oligosaccharide, ledit précurseur ou lesdits intermédiaires métaboliques.

La séquence d'acide nucléique codant pour l'enzyme selon l'invention est soit naturellement présente dans ladite cellule soit est introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant connues de l'homme du métier. Dans la présente 5 description, on entendra désigner par acide nucléique, un fragment d'ADN, aussi bien double brin que simple brin, que des produits de transcription desdits ADNs, et/ou un fragment d'ARN. Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN 10 recombinant et qui code pour un enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse de l'oligosaccharide d'intérêt est hétérologue. On entend désigner par séquence d'acide nucléique hétérologue, une séquence d'acide nucléique qui n'est pas présente naturellement dans la cellule selon l'invention. La séquence d'acide nucléique 15 hétérologue selon l'invention peut provenir de tout type cellulaire animal ou végétal, eucaryote ou procaryote et peut provenir de virus.

Parmi les cellules procaryotes à partir desquelles provient la 20 séquence d'acide nucléique hétérologue, il convient de citer les bactéries et notamment *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Thermophilus aquaticus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*.

25 Parmi les cellules eucaryotes unicellulaires à partir desquelles provient la séquence d'acide nucléique hétérologue il convient de citer les levures et notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*.

Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique hétérologue provient de cellules eucaryotes végétales ou animales. Selon un mode encore préféré, la séquence d'acide nucléique hétérologue provient de cellules de mammifères et de préférence de cellules humaines.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule selon l'invention est la bactérie *Escherichia coli* et la séquence d'acide nucléique introduite dans la bactérie et codant pour l'enzyme selon l'invention provient de préférence de bactérie choisie dans le groupe cité ci-dessus.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour l'enzyme selon l'invention est introduite dans ladite cellule sous la forme d'un vecteur d'expression. Le vecteur doit comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Le vecteur doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule au cours des générations successives et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de l'enzyme traduite. Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acides nucléiques peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou dans des vecteurs intégratifs qui s'intègre dans le génome de l'hôte choisi. De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte cellulaire approprié par des méthodes standard, telles par exemple le choc thermique ou l'électroporation.

L'invention vise en outre les cellules ci-dessus caractérisées en ce qu'elles sont transformées par au moins un acide nucléique isolé recombinant codant pour l'enzyme selon l'invention ou par au moins un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

5 Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ladite modification effectuée par ladite enzyme est choisie parmi la glycosylation, la sulfatation, l'acétylation, la phosphorylation, la succinylation, la méthylation et l'addition d'un groupe énolpyruvate, la sialylation, la fucosylation. Plus particulièrement,
10 le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ledit enzyme est un enzyme capable d'effectuer une glycosylation choisi parmi les glycosyl-transférases, les glycosyl-hydrolases, les glycosyl-phosphorylases. Selon un mode préféré de réalisation, l'enzyme capable d'effectuer la glycosylation est une glycosyl-transférase.
15 Selon un mode de réalisation préféré, la glycosyl-transférase selon l'invention est choisie parmi la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, la β -1,3 galactosyl-transférase, l' α -1,3 N-acétyl-galactosaminyl-transférase, la β -1,3 glucuronosyl-transférase, la β -1,3 N-acétyl-galactosaminyl-transférase, la β -1,4 N-acétyl-
20 galactosaminyl-transférase, la β -1,4-galactosyl-transférase, l' α -1-3-galactosyl-transférase, l' α -1,4-galactosyl-transférase, l' α -2,3-sialyl-transférase, l' α -2,6 sialyl-transférase, l' α -2-8 sialyl-transférase, l' α -1,3-fucosyl-transférase, l' α -1,4 fucosyl-transférase, l' α -1,2 fucosyl-transférase. Les glycosyl-transférases utilisées dans la présente
25 invention sont capables de la conjugaison stéréospécifique d'unité de saccharides spécifiques activés sur une molécule acceptrice spécifique. Les saccharides activés consistent en général en des dérivés de saccharides uridine-, guanosine- et cytidine-

diphosphate. Ainsi, les saccharides activés peuvent être un UDP-saccharide, un GDP-saccharide, un CMP-saccharide.

Certains gènes codant pour des glycosyl-transférases utilisées dans le procédé selon l'invention ont été 5 décrits au préalable ; ainsi la demande internationale de brevet WO 96 10086 décrit la synthèse classique d'oligosaccharide : au cours d'une première étape, les différentes glycosyl-transférases sont produites dans des bactéries recombinantes possédant les gènes *lgtA*, *lgtB* et *lgtC* de *Neisseria gonorrhoeae*, puis après purification 10 des enzymes recombinantes ainsi produites, les oligosaccharides sont synthétisés *in vitro* en présence des précurseurs et des nucléotides-sucres nécessaires.

Selon certains modes de réalisation de l'invention, l'enzyme capable d'effectuer une acétylation est codé par le gène *NodL* de la 15 bactérie *Azorhizobium caulinodans*. Selon un autre mode de réalisation, l'enzyme capable d'effectuer une sulfatation est codé par le gène *NodH* de la bactérie *Rhizobium meliloti*.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que ladite mise en culture cellulaire est effectuée de préférence sur un 20 substrat carboné ; selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ledit substrat carboné est choisi parmi le glycérol et le glucose. D'autres substrats carbonés peuvent également être employés ; il convient de citer le maltose, l'amidon, la cellulose, la 25 pectine, la chitine. Selon un autre mode de réalisation, la culture cellulaire est réalisée sur un substrat composé d'acides aminés et/ou de protéine et/ou de lipides.

Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que ladite étape de mise en culture est effectuée dans des conditions permettant l'obtention d'une culture à haute densité cellulaire ;

cette étape de mise en culture comprend une première phase de croissance cellulaire exponentielle assurée par ledit substrat carboné, une seconde phase de croissance cellulaire limitée par ledit substrat carboné qui est ajouté de manière 5 continue et enfin une troisième phase de croissance cellulaire ralentie obtenue en ajoutant de manière continue dans la culture une quantité dudit substrat diminuée par rapport à la quantité de substrat ajoutée à l'étape b) de façon à augmenter la teneur en oligosaccharides produits dans la culture à haute densité cellulaire.

10 Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la quantité de substrat ajouté de manière continue dans la culture cellulaire au cours de ladite phase c) est diminuée d'au moins 30%, de préférence 50%, de manière préférée 60% par rapport à la quantité de substrat ajouté de manière continue lors de ladite 15 phase b). Le procédé selon l'invention se caractérise également en ce que ledit précurseur exogène est ajouté lors de la phase b).

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé se caractérise en ce que ledit précurseur exogène est de nature glucidique, de préférence de nature oligosaccharidique.

20 L'originalité et la faisabilité du procédé selon l'invention reposent sur l'utilisation de deux modes d'internalisation du précurseur exogène qui ne détruisent l'intégrité de la cellule ni n'atteignent ses fonctions vitales. Ceci exclut notamment les techniques classiques de perméabilisation de la membrane par des 25 solvants organiques qui vont bloquer la croissance et le métabolisme énergétique. Les deux modes possibles d'internalisation du précurseur exogène utilisent un mécanisme de transport passif ou actif.

L'invention concerne tout d'abord un procédé caractérisé en ce que ledit du précurseur exogène est internalisé selon un mécanisme de transport passif. On entend désigner par internalisation par transport passif, la diffusion passive d'un précurseur exogène à travers la membrane plasmique, le flux moléculaire s'orientant des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées pour tendre finalement vers un état d'équilibre. L'internalisation par transport passif consiste à utiliser un précurseur exogène qui est suffisamment petit et hydrophobe pour diffuser passivement au travers de la membrane. Un précurseur, monosaccharidique ayant la position anomérique bloquée par un substituant alkyl constitue un exemple de précurseur susceptible d'être internalisé de cette manière. La présente invention concerne donc un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur exogène est un monosaccharide dont le carbone anomère est lié à un groupement alkyl ; de préférence ledit groupement alkyl est un groupement allyl. C'est donc un des objets de l'invention de fournir un procédé de production d'oligosaccharides qui possèdent un groupement fonctionalisable comme le groupement allyl et qui sont utilisables de ce fait comme précurseur pour la synthèse chimique de glycoconjugués (néoglycoprotéine ou néoglycolipides) ou de glycopolymères. En effet, la double liaison du groupement allyl est susceptible d'être ouverte par ozonolyse pour former un aldéhyde et permettre la conjugaison de l'oligosaccharide sur une protéine par amination réductive (Roy et al., 1997). Une autre voie est l'addition de cystéamine (Lee et Lee, 1974, Roy et al., 1997) sur la double liaison de l'allyl pour former un groupement amine terminal qui peut par exemple réagir avec les groupements carboxyliques des protéines.

Selon un mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention concerne la production du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl) ; le procédé se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, ledit enzyme est la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glycérol et ledit précurseur est l'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl). Enfin, selon un autre mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la double liaison du groupement allyl dudit (β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl) est modifiée chimiquement par des réactions d'addition, d'oxydation ou d'ozonolyse.

La présente invention concerne également un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur est internalisé selon un mécanisme de transport actif. On entend désigner par internalisation par transport actif, l'aptitude des cellules et de manière préférée les bactéries à admettre et concentrer sélectivement certaines substances ou précurseurs exogènes dans leur cytoplasme. Ce transport est réalisé par des transporteurs de nature protéique appelés perméases qui agissent comme des enzymes ; les perméases sont des catalyseurs inductibles, c'est-à-dire synthétisés en présence de substrat ou du précurseur. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le lactose et les β -galactosides constituent des précurseurs qui sont transportés activement dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli* par la lactose perméase encore appelée galactoside perméase. L'invention concerne donc un procédé selon l'invention caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose perméase. Le lactose perméase possède une spécificité assez large qui lui permet de transporter, outre le lactose, d'autres molécules.

Elle est en effet capable de transporter divers β -galactosides naturels ou synthétiques, des α -galactosides et le saccharose. C'est donc l'un des objets de l'invention de fournir, selon un mode préféré de réalisation, un procédé caractérisé en ce que ledit précurseur est

5 le lactose qui constitue le motif de base de très nombreux oligosaccharides biologiquement actifs. Il est également dans l'étendue de l'invention de fournir un procédé caractérisé en ce que en ce que ledit précurseur est choisi dans le groupe composé de : (i) β -galactosides naturels ou synthétiques, de préférence dans le 4-O-

10 β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose (lactulose), le 3-O- β -D-galactopyranosyl-D-arabinose et l'allyl- β -D-galactopyranoside , (ii) d' α -galactosides, de préférence le mélibiose et le raffinoose, l'allyl- α -D-galactopyranoside (iii) de saccharose.

La spécificité de la lactose perméase peut même être modifiée

15 par mutation et permettre le transport d'autres composés tels le maltose et le cellobiose. Tous ces composés peuvent donc être utilisés comme précurseur pour la synthèse d'oligosaccharides. Il est également dans l'étendue de cette invention d'utiliser comme précurseurs des analogues du lactose possédant un groupement

20 chimiquement réactif pour une fonctionnalisation ultérieure du produit de préférence un de ces analogues est l'allyl β -D-galactopyranoside. Il est également dans l'étendue de cette invention d'utiliser d'autres perméases modifiées ou non par les techniques de l'ADN recombinant pour permettre l'internalisation

25 de différents types de précurseurs.

Les β -galactosides sont normalement hydrolysés dans le cytoplasme de la bactérie par la β -galactosidase codée par le gène *LacZ*. Afin de s'affranchir de ce problème, un mutant bactérien *lacZ*-dépourvu d'activité β -galactosidase est utilisé lorsque le précurseur

employé est le lactose et/ou un β -galactoside. C'est donc également un des objets de l'invention de fournir le procédé selon l'invention caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur ainsi que 5 lesdits intermédiaires métaboliques.

Selon un mode particulier, l'invention se rapporte à un procédé décrit ci-dessus caractérisé en ce que ledit précurseur est l'acide sialique. Dans ce cas, ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la perméase NanT.

10 Selon un autre mode particulier, l'invention porte sur un procédé décrit ci-dessus caractérisé en ce que ledit précurseur est l'acide sialique et le lactose. Dans ce cas, ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose perméase et la perméase NanT.

15 Dans le procédé selon l'invention, ladite cellule peut être dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur ou lesdits précurseurs.

Selon un mode préféré de réalisation, le procédé se caractérise en ce que ladite cellule a un génotype choisi parmi *LacZ*- et/ou *NanA*-.

20 Selon un autre aspect de l'invention, le procédé se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'addition d'un inducteur dans ledit milieu de culture pour induire l'expression dans ladite cellule dudit enzyme et/ou d'une protéine impliquée dans ledit transport actif; selon un mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention 25 est caractérisé en ce que ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ladite protéine est la lactose perméase.

L'invention permet pour la première fois de produire des oligosaccharides complexes avec des rendements de l'ordre du gramme par litre. Selon sa taille, l'oligosaccharide soit s'accumule

dans le cytoplasme bactérien, soit est sécrété dans le milieu de culture. Ainsi, selon un mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-5 galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*⁺, ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, ledit substrat est le glycérol, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ledit 10 précurseur est le lactose.

Selon un deuxième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine ; il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *Lac Z*, *Lac Y*⁺, lesdits enzymes 15 sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glucose, ledit inducteur est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), ledit précurseur est le lactose.

Selon un troisième mode préféré de réalisation, le procédé 20 selon l'invention est utilisé pour la production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*⁺, ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, ledit 25 substrat est le glycérol, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

Selon un quatrième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production d'analogues du lacto-

N-néo-tétraose et de polylactosamines dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl ; il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+, lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et 5 la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glucose, ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

Selon un cinquième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour production de l'allyl- β -D-lactosamine (β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNac-1->O-allyl); il se caractérise en ce que ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+, ledit enzyme est la β -1,4-galactosyl-transférase, ledit substrat est le glycérol, ledit précurseur est l'allyl-N-acétyl β -D-glucosaminide (β -D-GlcNac-[1->O-allyl]).

15 L'invention concerne également un procédé qui permet d'envisager la production d'un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par glycosylation du lactose. En effet, outre les gènes *lgtA* et *lgtB* qui code respectivement pour la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase, 20 plusieurs gènes de glycosyl-transférases bactériennes utilisant le lactose comme précurseur ont été récemment clonés. Il s'agit de *lgtC* (β -1,4-galactosyl-transférase) et de *Lst* (α -2,3 sialyl-transférase) (Gilbert *et al.*, 1997). L'utilisation de ces gènes dans un procédé selon l'invention permet de produire des molécules comme 25 le globotriose (P^k blood antigen) et le sialyl-lactose. Par ailleurs, la coexpression des gènes *LgtA* et *LgtB* avec le gène de la α -1,3 fucosyl-transférase de *Helicobacter pylori* (Martin *et al.*, 1997) selon un procédé selon l'invention permet l'obtention du Lewis^x

pentasaccharide. L'addition du gène *Lst* (α -2,3 sialyl-transférase) donne accès au sialyl Lewis^x hexasaccharide.

Le procédé selon l'invention permet également d'obtenir un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par 5 glycosylation de précurseurs exogènes autre que le lactose et transportés par la lactose perméase ou par d'autres perméases.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir un grand nombre d'oligosaccharides différents obtenus par modification (sulfatation, acétylation, phosphorylation, succinylation, 10 méthylation, addition d'un groupement énolpyruvate) *in vivo* de précurseurs. La synthèse de certains oligosaccharides peut nécessiter outre la modification de précurseurs exogènes, la modification de précurseurs endogènes. Ainsi, il est envisageable d'introduire dans une bactérie *Escherichia coli* K12 le gène 15 d'enzyme impliqué dans le métabolisme de précurseur endogène pour permettre la production de certains nucléotides-sucres tels que par exemple le CMP-acide sialique, l'UDP-GalNAc ou le GDP-fucose qui ne sont pas normalement produit par cette souche bactérienne, afin de réaliser la synthèse d'un oligosaccharide 20 d'intérêt. Par exemple, l'UDP-GalNAc peut être produit à partir de l'UDP-GlcNAc si le gène de l'épimérase est introduit dans une cellule selon l'invention.

Contrairement à la méthode enzymatique de synthèse *in vitro* 25 d'oligosaccharides qui nécessite l'utilisation de molécules très onéreuses comme l'ATP, l'acétyl-CoA, le PAPS (adénosine 3' phosphate- 5'phosphosulfate), ou le phospho-énolpyruvate l'un des intérêts de la présente invention réside dans le fait que ces molécules sont naturellement recyclées dans la cellule permettant ainsi d'abaisser les coûts de production des oligosaccharides.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé décrit ci-dessus pour la production du 3'-sialyllactose(α -NeuAc-[2 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-Glc) ou du 6'-sialyllactose (α -NeuAc-[2 \rightarrow 6]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-Glc) caractérisé en ce que :

- 5 • ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+, *NanA*-, *NanT*+ ;
- lesdits enzymes sont la CMP-NeuAc-synthase et l' α -2,3 sialyl-transférase ou l' α -2,6 sialyl-transférase;
- ledit substrat est le glycérol ;
- 10 • ledit inducteur est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- lesdits précurseurs sont le lactose et l'acide sialique.

Selon un sixième mode préféré de réalisation qui complète le deuxième mode décrit ci-dessus, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production d'un dérivé sialylé du lacto-N-néotétraose 15 et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi l' α -2,3 sialyl-transférase, l' α -2,6 sialyl-transférase, et que ladite cellule a en outre un génotype *NanA*-, *NanT*+ et exprime le gène de la CMP-NeuAc-synthase, lesdits accepteurs sont le lactose et l'acide sialique.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé décrit ci-dessus pour la production du lacto-N-néotétraose, du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3]) β -D-Glc, du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-Glc, du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β ,D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-Glc,
25 caractérisé en ce que

- ladite cellule est une bactérie de génotype *Lac Z*, *Lac Y⁺*, *Wca J*, et surexprime *RcsA* ;
- lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, la β -1,4-galactosyl-transférase, la α -1,3 fucosyl-transférase ;
 - ledit substrat est le glucose ;
 - ledit inducteur est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
 - ledit précurseur est le lactose.

Selon un septième mode préféré de réalisation, le procédé 10 selon l'invention est utilisé pour la production de 3'fucosyllactose (β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3]-D-Glc) ou de 2'fucosyllactose (β -D-Gal-[1 \rightarrow 2]-(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3]-D-Glc) caractérisé en ce qu'il comprend un dit enzyme choisi parmi l' α -1,3 fucosyltransférase ou l' α -1,2 fucosyltransférase, et que la cellule a un génotype *wcaJ lacZ* et 15 surexprime le gène *rcsA* et que ledit précurseur est le lactose.

Selon un huitième mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention est utilisé pour la production d'un dérivé fucosylé 20 du lacto-N-néotétraose et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi l' α -1,2 fucosyl-transférase, l' α -1,3 fucosyl-transférase, et que ladite cellule a en outre un génotype *Wca J* et surexprime le gène *Rcs A*, ledit accepteur étant le lactose.

Selon un neuvième mode préféré de réalisation, le procédé 25 selon l'invention est utilisé pour la production d'un dérivé sialylé et fucosylé du lacto-N-néotétraose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi le l' α -2,3 sialyl-transférase, l' α -2,6 sialyl-transférase, et en outre un dit enzyme choisi parmi l' α -1,2 fucosyl-transférase, l' α -1,3 fucosyl-

transférase, et que ladite cellule a en outre un génotype *NanA*-, *NanT*+, *Wca J* et surexprime le gène *Rcs A* et le gène de la CMP-NeuAc-synthase, lesdits accepteurs sont le lactose et l'acide sialique.

5 Les procédés des modes 1 à 9 évoqués précédemment peuvent être mis en oeuvre pour la production d'analogue d'oligosaccharides dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl, ledit précurseur étant l'allyl- β -D galactoside et non plus le lactose.

10 Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé pour produire des oligosaccharides marqués ou enrichis avec des radioisotopes; de tels oligosaccharides sont extrêmement précieux pour les études fondamentales de biologie ou d'analyse conformationnelle. L'invention concerne donc un procédé de 15 production d'oligosaccharide marqué par au moins un radioisotope caractérisé en ce que ladite cellule est cultivée sur ledit substrat carboné marqué par ledit radioisotope et/ou en présence d'undit précurseur marqué par ledit radioisotope. Les radioisotopes sont choisis de préférence dans le groupe composé de : ^{14}C , ^{13}C , ^3H , ^{35}S , 20 ^{32}P , ^{33}P .

L'invention concerne aussi un oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention.

25 Selon un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un oligosaccharide activé utilisable pour la synthèse chimique de glycoconjugués ou de glycopolymères susceptible d'être obtenu par un procédé tel que décrit précédemment, ledit oligosaccharide étant caractérisé en ce que la double liaison du groupement allyl est modifiée chimiquement par des réactions d'addition, d'oxydation, ou d'ozonolyse.

L'oligosaccharide selon l'invention est utile dans une large gamme d'applications thérapeutiques et diagnostiques ; il peut par exemple être utilisé comme agent bloquant de récepteurs de surface cellulaire dans le traitement de multiples maladies faisant 5 intervenir l'adhésion cellulaire ou être utilisé comme suppléments nutritionnels, antibactériens, agents anti-méタstatiques, agents anti-inflammatoires. L'invention concerne donc un oligosaccharide selon l'invention à titre de médicament et notamment à titre de médicament destiné à empêcher sélectivement l'adhésion de 10 molécules biologiques. L'oligosaccharide selon l'invention est également utilisé à titre de médicament destiné au traitement du cancer, de l'inflammation, des maladies cardiaques, du diabète, des infections bactériennes, des infections virales, des maladies neurologiques et à titre de médicament destinés aux greffes. 15 L'invention porte également sur une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un oligosaccharide selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Enfin, l'invention concerne aussi l'utilisation d'un oligosaccharide selon l'invention dans l'agriculture et l'agronomie 20 notamment pour la croissance et la défense des végétaux. En effet, les oligosaccharides jouent un rôle prédominant dans la symbiose Rhizobium/légumineuse. En effet, certains oligosaccharides provenant de l'hydrolyse de parois ou de glycoprotéines végétales ou fongiques peuvent agir comme phytohormones ou comme 25 éliciteurs de réactions de défenses chez les plantes.

L'intérêt industriel du procédé selon l'invention est évident car il permet pour la première fois d'atteindre une production de l'ordre du kilogramme d'oligosaccharides complexes d'intérêt biologique. Tous les oligosaccharides d'intérêt biologique dont nous

envisageons la synthèse à l'échelle industrielle ne sont actuellement disponibles qu'à l'échelle du mg et à des coûts extrêmement élevés (jusqu'à 1 million de franc le gramme) ; le prix de revient de ces composés produits par la présente voie microbiologique sont 5 infiniment moindres.

Des caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples et des figures suivantes dont les légendes sont représentées ci-après.

10

FIGURES

15 **Figure 1 : Principe du procédé de production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galacto-pyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc)**

20 Le lactose (β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc) est transporté dans la cellule par la lactose perméase (Lac perméase). Le lactose ne peut pas être hydrolysé dans la cellule car la souche est un mutant *LacZ*. L'expression du gène *lgtA* permet la production de l'enzyme 25 LgtA qui transfère un GlcNAc de l'UDP-GlcNAc sur une molécule de lactose. Le trisaccharide formé (β -D-GlcNAc-[1-3]- β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc) est excrété dans le milieu.

25 **Figure 2 : Culture à haute densité cellulaire de la souche JM109 témoin et de la souche JM109 (pCWlgtA) possédant le gène de la glycosyle transférase LgtA.**

Le lactose est ajouté en continu et le lactose résiduel est déterminé enzymatiquement. La concentration de GlcNAc hydrolysable dans le milieu de culture est mesurée colorimétriquement après hydrolyse acide. Le lactose ajouté

représente la quantité totale cumulée de lactose qui a été ajouté en continu.

Figure 3 : Spectre de masse en mode FAB⁺ du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc) purifiée du surnageant de culture de la souche JM109(lgtA).

On observe les deux ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ à m/z 546 et 568. On observe également un ion $[M+H]^+$ à m/z 442 qui est du à la présence de β -D-GlcNAc-[1-3]-IPTG. Ceci indique que l'IPTG (isopropyl β -D-thiogalactose) utilisé pour induire la Lac perméase et LgtA est également glycosylé.

Figure 4 : Spectre du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc) en RMN du proton à 323°K.

Le signal à 1,4 ppm est du aux protons du groupement isopropyl du dérivé glycosylé de l'IPTG.

Figure 5 : Spectre RMN ^{13}C du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc).

Figure 6: Principe du procédé de production du lacto-N-néo-tétraose (β -D-Gal-[1-4]- β -D-GlcNAc-[1-3]- β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc).

Le lactose (β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc) est transporté dans la cellule par la Lac perméase. Le lactose ne peut pas être hydrolysé dans la cellule car la souche est un mutant *LacZ*. L'expression du gène *lgtA* permet la production de l'enzyme LgtA qui transfère un GlcNAc de l'UDP-GlcNAc sur une molécule de lactose. Le

trisaccharide formé est ensuite utilisé comme précurseur par LgtB qui transfère une molécule de galactose de l'UDP-Gal pour former le lacto-N-néo-tétraose (β -D-Gal-[1-4]- β -D-GlcNAc-[1-3]- β -D-Gal-[1-4]- β -D-Glc).

5 **Figure 7 : Culture à haute densité cellulaire de la souche JM109 (pCWlgtA, pBBlgtB).**

Culture en présence de lactose à forte (5 g.l⁻¹) et à faible concentration (1 g.l⁻¹).

10 **Figure 8 : Séparation sur Biogel P4 des oligosaccharides produits par la souche JM109 (pCWlgtA, pBBlgtB) en présence de lactose à une concentration initiale de 5 g.l⁻¹ (A) ou de 1 g.l⁻¹ (B).**

15 Les pics 1, 2, 3, 4 correspondent respectivement aux lacto-N-néo-tétraose, lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose et lacto-N-néo-décaose.

Figure 9 : Principe du procédé de production du sialyllactose

Le lactose et l'acide sialique (NeuAc) sont internalisés dans la cellule par la lactose permease (*lacY*) et la permease de l'acide sialique (*nanT*). Ces deux composés ne sont pas dégradés dans la cellule car la souche est un mutant *lacZ* et *nanA*.
5 L'expression de la CMP-NeuA synthase et de l'α-2,3 sialyltransferase permet l'activation de l'acide sialique internalisé en CMP-NeuAc et son transfert sur du lactose intracellulaire.

EXEMPLES

Exemple 1 : Matériels et méthodes

10 1.1. Origine des plasmides et souches bactériennes

Les souches JM107 et JM109 d'*Escherichia coli* K12 (Yannisch-Perron et al 1984) ont été utilisées comme cellules hôte pour tous les exemples de production d'oligosaccharides décrits. Les souches ont été obtenues de la DSM (Deutsche Sammlung von 15 Mikroorganismen) Le génotype de la souche JM109 est le suivant : *F* *traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14-(McrA⁻) Δ(lac-proAB) supE44 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 relA1*. Le génotype de la souche JM107 est identique à celui de la souche JM109 excepté le fait que le gène *recA1* n'est pas inactivé.

20 Les gènes *lgtA* et *lgtB* de *Neisseria meningitidis* MC58 ont été fournis par Dr W. Wakarchuk (Institute for Biological Sciences, National Research council of Canada, 100 Sussex Drive, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada) sous la forme de deux plasmides pCW, l'un contenant le gène *lgtA* (nommé ici pCWlgtA) et l'autre 25 contenant le gène *lgtB* (nommé ici pCWlgtB). Les séquences de ces deux gènes sont disponibles dans la banque de données GenBank sous le n° U25839. Le plasmide pLitmus28 a été acheté à la société

New Englands Biolabs. Le plasmide pBBR1MCS a été fourni par le Dr M. Kovach (Department of Microbiology and Immunology, Louisiana State University, Shreveport, LA 71130-3932, USA.)

Les gènes de la CMP-sialic acid synthase et de l'α-2,3 sialyltransferase de *Neisseria meningitis* MC58 ont été fournis par le Dr M Gilbert (Institute for Biological Sciences, National Research council of Canada, 100 Sussex Drive, Ottawa, Ontario, K1A OR6, Canada) sous la forme de deux plasmides NSY-01 et NST-01. Le plasmide NSY-01 est un dérivé du plasmide pT7-7 qui contient le gène (GenBank U60146) de la CMP-sialic acid synthase (Gilbert et al 1997). Le plasmide NST-01 est un dérivé du plasmide pBluescript Sk- qui contient le gène (GenBank n° U60660) de l'α-2,3 sialyltransferase (Gilbert et al. 1996)

Le gène *fucT* de l'α-1,3 fucosyltransferase d'*Helicobacter pylori* a été fourni par le Dr S. Martin (Glaxo Wellcome Research and Development, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, SG1 2NY, UK) sous la forme d'un plasmide pHP0651 dérivé du pET-21a . La sequence est disponible à la Genbank (AE000578, gène HP0651).

20

1.2. Sous-clonages.

Nous avons utilisé les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook et al. (1989).

construction du plasmide pBB₁gtB : Le fragment d'ADN de 0,835 kb contenant le gène *lgtB* a été obtenu par digestion du plasmide pCW₁gtB par *Bam*H_I et *Hind*III. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pLitmus28 préalablement digéré par *Bam*H_I et *Hind*III pour former le plasmide pLit₁gtB. Le fragment de 0,9 kb contenant le gène *lgtB* a été excisé du plasmide pLit₁gtB par une

digestion avec *Xhol* et *HindIII* et sous cloné dans le plasmide pBBR1MCS préalablement digéré par *Xhol* et *HindIII* pour former le plasmide pBBtgtB.

construction du plasmide pBBnsy : Le fragment contenant 5 le gène de la CMP-sialic acid synthase a été excisé du plasmide NSY-01 par une digestion avec *XbaI* et sous cloné dans le plasmide pBBR1MCS préalablement digéré par *XbaI* pour former le plasmide pBBnsy.

construction du plasmide pBBLnt : le gène *lgtA* présent 10 dans la construction pCWlgtA (Gilbert *et al.*) a été amplifié par PCR en même temps que le promoteur UV5 tactac du plasmide à l'aide des amorces CTTTAAGCTTCCGGCTCGTATAA (sens, amont promoteur) et GACAGCTTATCATCGATAAGCTT (antisens, fin *lgtA*) 15 contenant toutes deux un site *HindIII*. Le fragment amplifié de 1,3kb a ensuite été sous-cloné dans le site *HindIII* du vecteur pBBtgtB.

construction du plasmide pBBLntRcsA : Le gène *rcsA* (Stout *et al.*, 1991) a d'abord été amplifié par PCR à partir d'ADN 20 génomique de JM109 avec les amorces AGGGTACCCATGTTGTTCCGGTTAG (site *KpnI*, gauche *rcsA*) et AATCTAGAGTAATCTTATTCAAGCCTG (site *XbaI*, droite *rcsA*), puis cloné dans les sites *KpnI-XbaI* du vecteur pBBR1-MCS. Le vecteur pBBR1-MCS-*rcsA* a alors été ouvert en amont du gène par digestion 25 avec *KpnI*, blunté (kit Amersham), libéré par *XbaI*, et inséré dans les sites *SmaI-XbaI* de la construction pBBLnt, permettant un clonage en aval de l'ensemble *lgtB-UV5tactac-lgtA*, plaçant *rcsA* sous le contrôle du promoteur UV5 tactac.

1.3. Conditions de culture

Les cultures de routine et la préparation des inocula furent réalisées sur le milieu LB (Sambrook *et al.* 1989). Les cultures à haute densité cellulaire ont été réalisées dans un fermenteur de 2 litres contenant un volume initial de 1 litre de milieu ayant la composition suivante : glycérol (17.5 g.l⁻¹) ou glucose (15 g.l⁻¹), NH₄H₂PO₄ (7 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (7 g.l⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1 g.l⁻¹), thiamine.HCl (4.5 mg.l⁻¹), solution d'oligo-éléments (7.5 ml.l⁻¹), acide citrique (0.5 g.l⁻¹), KOH (2 g.l⁻¹). Le MgSO₄ est autoclavé 5 séparément et la thiamine est stérilisée par filtration. La solution d'oligo-éléments contient : nitrilotriacétate (70 mM, pH 6.5), citrate ferrique (7.5 g.l⁻¹), MnCl₂. 4H₂O (1.3 g.l⁻¹), CoCl₂ 6H₂O (0.21 g.l⁻¹), CuCl₂.2H₂O (0.13 g.l⁻¹), H₃BO₃ (0.25 g.l⁻¹), ZnSO₄. 7H₂O (1.2 g.l⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0.15 g.l⁻¹). Les antibiotiques, ampicilline (50 10 mg.l⁻¹) et chloramphénicol (25 mg.l⁻¹) sont ajoutés pour s'assurer de la présence des différents plasmides. La solution d'alimentation contient du glycérol (500 g.l⁻¹) ou du glucose (400 g.l⁻¹), du 15 MgSO₄.7H₂O (12 g.l⁻¹) et de la solution d'oligo-éléments (25 ml.l⁻¹).

Les cultures à haute densité cellulaire sont inoculées à 2%. 20 Durant tout la culture, le taux d'oxygène dissous est maintenu à 20% de saturation en réglant manuellement le débit d'air et en ajustant automatiquement la vitesse d'agitation. Le pH est régulé automatiquement à 6,8 par l'addition d'ammoniaque aqueux (15% p/v). La température est maintenue à 34°C pour la souche 25 JM109(pCWlgtA) et à 28°C pour la souche JM109(pCWlgtA, pBBlgtB). La stratégie de culture à haute densité comprend généralement 3 phases : une première phase de croissance exponentielle qui est assurée par le substrat carboné (glycérol ou

glucose) initialement présent dans le milieu ; une deuxième phase qui débute lorsque la croissance devient limitée par la source de carbone qui est alors ajoutée en continu à un taux de $4,5 \text{ g.h}^{-1}.\text{l}^{-1}$ de glycérol ou $3,6 \text{ g.h}^{-1}.\text{l}^{-1}$ de glucose. Dans une troisième phase, ce 5 taux est réduit de 60 % pour ralentir la croissance de manière à augmenter la teneur en oligosaccharides.

1.4. Dosage des oligosaccharides

Les échantillons (1 ml) sont prélevés durant la culture et immédiatement centrifugés dans des microtubes. Le surnageant est 10 conservé pour le dosage des oligosaccharides extracellulaires. Le culot bactérien est resuspendu dans 1 ml d'eau puis est incubé dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min pour faire éclater les cellules. Après une seconde centrifugation le surnageant est conservé pour le dosage des oligosaccharides intracellulaires.

15 La concentration de lactose est mesurée en utilisant un kit de détermination enzymatique (Roche diagnostic). Les résidus *N*-acétyl-glucosamine présents dans les oligosaccharides sont libérés par hydrolyse acide comme précédemment décrit (Samain *et al.*, 1997) et ensuite quantifiés colorimétriquement par la méthode de 20 Reissig *et al.*, (1955); dans la description, on entend par GlcNAc hydrolysable, la quantité de GlcNAc dosée de cette manière.

Le dosage du lactose avec et sans traitement par une neuraminidase permet d'estimer la concentration en sialyl-lactose.

25 Le fucose total est mesuré colorimétriquement par la méthode au chlorhydrate de cystéine de Dische et Shettles (1948).

1.5. Purification des oligosaccharides

A la fin de la culture, les cellules bactériennes sont récoltées par centrifugation. Le surnageant est conservé pour la purification

des oligosaccharides extracellulaires. Les cellules bactériennes sont resuspendues dans 1 litre d'eau, puis sont perméabilisées par un traitement thermique (30 min à 100°C) pour libérer les oligosaccharides intracellulaires. Après une deuxième 5 centrifugation ces oligosaccharides sont récupérés dans le surnageant.

Le premier et le deuxième surnageant contenant respectivement les oligosaccharides extra- et intracellulaires sont adsorbés sur charbon actif (100 g par litre de surnageant). Après 10 rinçage à l'eau distillée, les oligosaccharides sont élués avec de l'éthanol à 50% (v/v), concentrés par évaporation et lyophilisés.

Les oligosaccharides sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne (4.5 cm x 95 cm) de Biogel P4 permettant l'injection d'environ 300 mg de mélange 15 d'oligosaccharides. L'élution est réalisée avec de l'eau distillée avec un débit de 40 ml.h⁻¹.

Les oligosaccharides non fucosylés sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne (4.5 cm x 95 cm) de Biogel P4 permettant l'injection d'environ 300 mg de 20 mélange d'oligosaccharides. L'élution est réalisée avec de l'eau distillée avec un débit de 40 ml.h⁻¹

Les oligosaccharides fucosylés sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne (1,5 cm x 200 cm) de Biogel P2 thermostatée à 60 °C permettant l'injection 25 d'environ 30 mg de mélange d'oligosaccharides. L'élution est réalisée avec de l'eau distillée avec un débit de 30 ml.h⁻¹

Le sialyllactose est séparé des oligosaccharides neutres par fixation sur une résine Dowex 1X4-400 (sous forme HCO₃⁻). et élué avec un gradient de NaHCO₃ (0 à 100mM). Le bicarbonate est

ensuite éliminé en traitant l'éluat par une résine Dowex 50X4-400 sous forme H⁺.

1.6. Préparation des allyl β-D-glucosides

5 L'allyl β-D-galactopyranoside et l'allyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide ont été synthétisés suivant le protocole décrit par Lee et Lee (1974)

1.7. Identification et caractérisation structurale des 10 oligosaccharides

Les spectres de masse ont été réalisés avec un spectromètre de masse (Nermag R-1010C). Pour chaque expérience le volume initial de matrice est de 4 µl. Les produits ont été analysés en mode FAB⁺.

15 Les spectres de RMN ont été obtenus avec un spectromètre Brucker AC300.

1.8 Construction de la souche JM107-nanA-

Une souche JM107 incapable de métaboliser l'acide sialique a 20 été préparée par inactivation insertionnelle du gène *nanA* (opéron Nan) codant pour la NeuAc aldolase (Plumbridge et al., 1999). Deux réactions d'amplification par PCR furent réalisées de part et d'autre du centre du gène *nanA* de façon à y insérer un site de restriction *BamHI*.

25 Un premier fragment *BamHI-XbaI* de 1,6 kb comprenant la partie droite de *nanA* a été amplifié à partir d'ADN génomique de JM109 en utilisant les amorces AAAGGATCCAAGATCAGGATGTTCACG et GCTCTAGAATGGTAATGATGAGGCAC et cloné entre les sites

BamHI et *XbaI* du vecteur pUC19, formant le vecteur pUC-nan1,6. Un deuxième fragment *KpnI-BamHI* de 2,1 kb comprenant la partie gauche de *nanA* a été amplifié en utilisant les amorces AAAGGATCCGCGTAGGTGCGCTGAAAC et

5 AAAGGTACCTCAGGCCACCGTTAGCAG et cloné entre les sites *KpnI* et *BamHI* du vecteur pUC-nan1,6 formant le vecteur pUC-nan-3,7. Le gène de résistance à la kanamycine (pUC-4K, cassette Pharmacia) a ensuite été cloné dans le site *BamHI* de pUC-nan-3,7. Le fragment de 4,9 kb *SacI-XbaI* contenant *nanA::kan* a été

10 inséré dans les mêmes sites du vecteur suicide pCVD442 (Donnenberg et Kaper 1991). Ce plasmide a été utilisé pour obtenir par recombinaison homologue des mutants JM107 *nanA::kan*, sélectionnés pour leur résistance à la kanamycine et leur incapacité à métaboliser l'acide sialique (souche JM107-nanA-).

15

1.9 Construction de la souche JM107col-DE3

La suppression de la capacité à synthétiser l'acide colanique a été réalisée par inactivation insertionnelle du gene *wcaJ* codant pour une glucosyltransférase (Stevenson et al 1996). Un fragment d'ADN de 1,8 kb contenant le gène *wcaJ* et de l'ADN adjacent ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de JM109 et insérés dans un vecteur pTOPO2.1 (kit de clonage PCR Invitrogen), à l'aide des amorces CCACGATCCACGTCTCTCC (droite *wcaJ*) et AAGCTCATATCAATATGCCGCT (gauche *wcaJ*). Il a ensuite été

20 transféré dans un vecteur pUC19 au niveau du site *EcoRI*. Le vecteur ainsi obtenu a été soumis à un traitement par une *EcoRI* méthylase, permettant l'addition subséquente du gène de résistance à la kanamycine dans le site ApoI présent au centre de *wcaJ*. L'ADN recombinant *wcaJ::kan* a enfin été transféré dans le

25

vecteur suicide pCVD442 permettant par recombinaison homologue l'obtention de mutants génomiques JM107 contenant le gène inactivé, sélectionnés par PCR à l'aide des amorces ayant servi au clonage (souche JM107-col⁻).

5 La souche JM107-col⁻ a été rendue lysogène pour le phage λ DE3 en utilisant le kit de lysogénisation de Novagen.

10 **Exemple 2 : Production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc).**

15 Le principe est illustré par la figure 1. Nous avons utilisé la souche JM 109 d'*Escherichia coli* K12 dans laquelle nous avons introduit le plasmide pCWlgtA gène *lgtA*. La souche JM109 est *lacZ*⁻, c'est à dire qu'elle est incapable d'hydrolyser le lactose. Par contre elle est *lacY*⁺, ce qui signifie qu'elle peut synthétiser la lactose perméase. Le gène *lgtA* code pour une β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase (LgtA) transférant une unité N-acétyl-glucosamine sur le galactose du lactose.

20 La souche JM109 (pCWlgtA) ainsi que la souche témoin JM109 ont été cultivées à haute densité cellulaire (Samain *et al.*, 1997) sur glycérol comme source de carbone et d'énergie. Après une première phase de croissance exponentielle assurée par le glycérol initialement présent dans le milieu (17,5 g/l), la croissance devient 25 limitée par le glycérol qui est alors ajouté en continu à un taux de 4,5 g.h⁻¹.l⁻¹. Durant cette deuxième phase de la culture, on introduit en continu 90 mg.h⁻¹.l⁻¹ de lactose. On injecte également au début de cette phase de l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) (0.5 mM) pour induire l'expression de la lactose perméase et de la

β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase. Comme décrit dans la figure 2, le lactose ajouté ne s'accumule pratiquement pas dans le milieu, indiquant que le lactose est bien internalisé par les cellules bactériennes. On observe avec la souche JM 109 (pCWlgtA) une 5 accumulation importante dans le milieu de culture d'un composé contenant de la N-acétylglucosamine (GlcNAc hydrolysable). La quantité de GlcNAc hydrolysable (3,8 mmole/l) produite correspond presque stoechiométriquement à la quantité de lactose consommé (3,5 mmole/l), suggérant que la totalité du lactose internalisé a été 10 glycosylée par LgtA.

A la fin de la culture, les cellules sont éliminées par centrifugation et les oligosaccharides présents dans le surnageant sont purifiés par adsorption sur charbon actif et élution à l'éthanol. Les oligosaccharides présents sont ensuite séparés suivant leur 15 poids moléculaire sur une colonne de Biogel P4. Un seul composé majoritaire est retrouvé. Les données de spectrométrie de masse et de RMN indique que ce composé est bien le trisaccharide (β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-Glc) formé par l'addition d'un résidu GlcNAc sur une molécule de lactose. Le spectre de masse en 20 mode FAB⁺ montre en effet la présence d'un ion quasi-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 546 (figure 3). Le spectre RMN du ¹H confirme la structure trisaccharidique, la présence d'un groupement acétyl et la configuration β des deux liaisons O-glycosidiques (figure 4). Le spectre RMN du ¹³C précise également que la liaison entre la 25 GlcNAc et le galactose est bien de type 1,3 (figure 5).

Exemple 3 : Production de lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine

Le principe est décrit sur la figure 6. La souche d' *E. coli* JM 109 a été cotransformée avec les deux plasmides pCWlgtA et pBBlgtB portant respectivement les gènes *lgtA* (utilisé précédemment) et *lgtB* (codant pour une β -1,4-Galactosyl-transférase appelé LgtB). La souche JM109 (pCWlgtA,pBBlgtb) a été cultivée à haute densité cellulaire en utilisant le glucose comme substrat de croissance. Au début de la deuxième phase on ajoute du lactose à forte (5 g.l⁻¹) ou à faible concentration (1 g.l⁻¹) et de l'IPTG à 0.1 mM. Contrairement à ce qui avait été observé avec la souche JM109 (pCWlgtA), on ne détecte, lors de la culture de cette souche, qu'une faible libération de GlcNAc hydrolysable dans le milieu. En revanche, on retrouve de la GlcNAc hydrolysable en quantité importante dans la bactérie (figure 7). Lorsque l'apport de lactose est de 1 g.l⁻¹, on observe une internalisation complète du lactose (2,9 mmole.l⁻¹) et une production totale de GlcNAc lié de 1,45 g.l⁻¹ (6,5 mmole.l⁻¹) soit l'incorporation de plus de deux molécules de GlcNAc par molécule de lactose acceptrice. Quand le lactose est ajouté à forte concentration, l'internalisation est incomplète (3 g.l⁻¹ soit 8,7 mmole.l⁻¹) avec une production de GlcNAc également d'environ 6,5 mmole⁻¹. Dans ce cas le rapport molaire GlcNAc / lactose est proche de 1, ce qui est cohérent avec la synthèse de lacto-*N*-néo-tétraose.

La purification de la fraction oligosaccharidique intracellulaire a permis d'obtenir plusieurs composés principaux qui sont bien séparés par chromatographie sur Biogel P4. Les données de spectrométrie de masse et de RMN indiquent que ces composés correspondent aux structures suivantes : lacto-*N*-néo-tétraose $[M+H]^+ = 708$; lacto-*N*-néo-hexaose $[M+H]^+ = 708$; lacto-*N*-néo-octaose, $[M+Na]^+ = 1460$ et probablement lacto-*N*-néo-décaose.

Les proportions respectives de ces différents composés dépendent de la quantité de lactose ajoutée . Ainsi avec 5 g.l⁻¹ de lactose le produit majoritaire est le lacto-*N*-néo-tetraose (figure 8A). Par contre un apport de lactose plus faible (1 g.l⁻¹) favorise la formation 5 de composés de plus haut degré de polymérisation, le lacto-*N*-néo-octaose devenant majoritaire (figure 8B).

La formation de polylactosamines homologues supérieurs du lacto-*N*-néo-tétraose s'explique par le fait que LgtA est capable d'utiliser le lacto-*N*-néo-tétraose pour former un pentasaccharide 10 intermédiaire qui est glycosylé par LgtB pour donner du lacto-*N*-néo-hexaose. Ce dernier est lui même précurseur pour un nouveau cycle de glycosylation aboutissant à la formation de lacto-*N*-néo-octaose et ainsi de suite jusqu'au lacto-*N*-néo-décaose.

On n'observe pas la formation significative d'oligosaccharides 15 à nombre de résidus impair et portant un galactose en position terminale non réductrice. Ceci indique que l'elongation des molécules est limitée par l'incorporation du GlcNAc par LgtA et non pas par la galactosylation catalysée par LgtB.

20 **Exemple 4 : Production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl)**

La souche JM109(pCW1gtA) a été cultivée à haute densité 25 cellulaire sur glycérol. Au début de la deuxième phase de culture, on ajoute 0,75 g.l⁻¹ d'allyl- β -D-galactopyranoside et 0,1 mM d'IPTG. On observe une internalisation totale de l'allyl- β -D-galactopyranoside au bout de 9 h avec une apparition stoechiométrique de GlcNAc hydrolysable dans le milieu

extracellulaire. Les oligosaccharides présents dans le milieu extracellulaire sont purifiés comme dans l'exemple 2. Le spectre de masse en mode FAB⁺ du produit majoritaire obtenu montre la présence d'un ion quasi-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 424 5 correspondant à la structure β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-A \rightarrow O-allyl.

Exemple 5 : Production du β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNAc-1->O-allyl

10

La souche JM109 (pBB_{lgtB}) a été cultivée à haute densité cellulaire sur glycérol. Au début de la deuxième phase de culture, on ajoute 0,5 g.l⁻¹ d'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (β -D-GlcNAc-1 \rightarrow Oallyl). On observe pendant les 5 premières heures une diminution d'environ 30% de la quantité de GlcNAc hydrolysable extracellulaire, ce qui démontre une internalisation partielle d'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide. Parallèlement on observe une production intracellulaire presque stœchiométrique de GlcNAc hydrolysable et de résidus galactose liés en β (hydrolysables par la 15 β -galactosidase). Ces résultats démontrent que 30% de l'allyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide initialement ajouté a été galactosylé par l'activité encodée par le gène *lgtB*. Après purification, la structure 20 du composé attendu (β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNAc-1 \rightarrow O-allyl) a été confirmée par spectrométrie de masse et RMN.

25

Exemple 6 : Production d'analogues du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamines dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl

La souche JM109 (pCWlgtA et pBBlgtB) a été cultivée comme dans l'exemple 3 sauf que l'apport de lactose a été remplacé par l'addition de 0,65 g.l⁻¹ d'allyl- β -D-galactopyranoside. Après purification selon le protocole de l'exemple 3, on obtient 3 composés 5 principaux. Les données de spectrométrie de masse indiquent que ces trois composés correspondent aux tri-, penta- et hepta-saccharides suivants :

10 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 586;
 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 951;
 β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-GlcNAc-[1->3]- β -D-Gal-1->O-allyl, [M+H] = 1316.

15

Exemple 7 : Production du 3'-sialyllactose (α -NeuAc-[2->3]- β -D-Gal-[1->4]- β -D-Glc)

Le principe est illustré par la figure 9. Les gènes de 20 biosynthèse de l'acide sialique et du CMP-NeuAc ne sont pas présents chez *E. coli* K12. Par contre *E. coli* K12 est capable de dégrader l'acide sialique (Plumbridge et. Vimr 1999) et possède une perméase (NanT) qui permet de faire pénétrer de l'acide sialique exogène dans la cellule. Cet acide sialique est ensuite normalement 25 catabolisé par une aldolase (NanA).

Nous avons utilisé la souche d'*Escherichia coli* K12 JM107-nanA (exemple 1) et une souche témoin JM107 dans lesquelles nous avons introduit les deux plasmides compatibles NST-01 et pBBnsy contenant respectivement les gènes de l' α -2,3

sialyltransferase et de la CMP-NeuAc synthase. Cette souche est dépourvue d'activité NanA et est donc incapable de dégrader de l'acide sialique intracellulaire. Par contre elle possède les gènes de la lactose permease (*lacY*) et de la sialyl permease (*nanT*) et est donc capable d'internaliser du lactose et de l'acide sialique exogène. L'acide sialique internalisé peut ainsi être activé en CMP-NeuAc sous l'action de la CMP-NeuAc synthase et transféré sur du lactose intracellulaire sous l'action de l'α-2,3 sialyltransferase.

La souche JM107-nanA-(Nst-01, pBBnsy) et la souche 10 témoin JM107 (Nst-01, pBBnsy) possédant l'activité NanA ont été cultivées à haute densité cellulaire sur glycérol. Du lactose (1,5 g.l⁻¹) de l'IPTG (0,1 mM) et de l'acide sialique (0,6 g.l⁻¹) sont ajoutés au début de la deuxième phase de culture d'une durée de 5 h. Durant toute la durée (17 h) de la troisième phase de la culture, on 15 introduit en continu 100 mg.h⁻¹.L⁻¹ d'acide sialique et 200 mg.h⁻¹.L⁻¹ de lactose.

A la fin de la culture de la souche JM107-nanA-(Nst-01, pBBnsy), le dosage enzymatique du lactose avec et sans traitement par une neuraminidase permet d'estimer la production totale de 20 sialyllactose à 2,6 g.l⁻¹. Cette production est retrouvée en partie dans les cellules bactériennes (1,5 g.l⁻¹) et dans le milieu extracellulaire de culture (1,1 g.l⁻¹). Dans le cas de la souche témoin JM107 (Nst-01, pBBnsy), la production de sialyllactose est beaucoup plus faible (150 mg.l⁻¹) indiquant que la quasi totalité de 25 l'acide sialique a été dégradée par la bactérie.

Les oligosaccharides intracellulaires et extracellulaires sont purifiés par adsorption sur charbon actif et élution à l'éthanol. Après purification sur résine échangeuse d'anions un seul produit est détecté en HPLC. Le spectre de masse en mode FAB⁺ montre la

présence de deux ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ à m/z 656 et $[M+Na]^+$ à m/z 678 correspondant au sel de sodium du sialyllactose.

5 **Exemple 8: Production de dérivés fucosylés du lacto-N-néo-tétraose**

10 Chez *E. coli* K12, les gènes de biosynthèse du GDP-fucose font partie de l'opéron responsable de la biosynthèse d'un polysaccharide extracellulaire, l'acide colanique (Stevenson et al 1996). L'expression de cet opéron est contrôlée par un réseau complexe de régulation dans lequel est impliquée la protéine RcsA (Stout et al 1991). La surexpression du gène *rcsA* se traduit ainsi par une surproduction d'acide colanique (Russo et Singh 1993) et 15 par conséquent des gènes de biosynthèse du GDP-fucose.

20 Pour augmenter la disponibilité en GDP-fucose, notre stratégie a consisté à utiliser une souche d'*E. coli* dans laquelle le gène *rcsA* était surexprimé (de manière à surproduire les gènes essentiels à la biosynthèse de l'acide colanique) et dans laquelle un des gènes essentiels à la biosynthèse de l'acide colanique a été inactivé (de manière à supprimer totalement la production d'acide colanique et éviter une compétition pour l'utilisation du GDP-fucose)

25 Nous avons utilisé la souche JM107-col-DE3 dans laquelle le gène *wcaJ*, qui est responsable du transfert du premier résidu glucose de l'unité de répétition, a été inactivé selon l'exemple 1 et dans laquelle nous avons introduit soit les deux plasmides pHp0651 et pBBLnt, soit les deux plasmides pHp0651 et pBBLntRcsA. Le plasmide pHp0651 contient le gène *fucT* de l' α -1,3 fucosyltransferase d'*Helicobacter pylori*. Cette fucosyltransférase

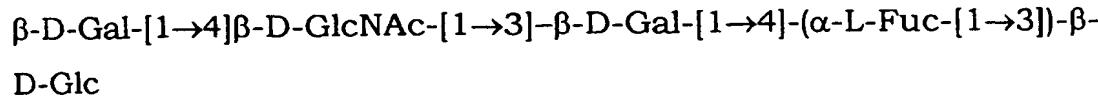
utilise comme accepteur la *N*-acetyllactosamine et le lacto-*N*-néotetraose mais pas le lactose (Martin et al 1997). Le plasmide pBBLnt contient les gènes *lgtA* et *lgtB*. Le plasmide pBBLntRcsA contient les gènes *lgtA*, *lgtB* et *rcsA*.

5 Les deux souches JM107-col-DE3 (pHP0651, pBBLnt) et JM107-col-DE3 (pHP0651, pBBLntRcsA) ont été cultivées comme dans l'exemple 3 en présence de 5 g.l⁻¹ de lactose. A la fin de troisième phase de culture la quantité de GlcNAc hydrolysable produite par les deux souches (1,7 g.l⁻¹) était comparable à celle 10 obtenu par la souche JM109 (pCWlgtA,pBBlgtb) dans l'exemple 3. Le dosage colorimétrique du fucose en fin de culture montre une différence importante entre les deux souches avec une production de fucose de 1g.l⁻¹ pour la souche JM107-col-DE3 (pHP0651, pBBLntRcsA) et de seulement 0,25 g.l⁻¹ pour la souche JM107-col- 15 DE3 (pHP0651, pBBLnt). Les oligosaccharides fucosylés sont retrouvés à plus de 70% dans la fraction intracellulaire.

La purification de la fraction intracellulaire par adsorption sur charbon actif et chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P2 permet de séparer quatre composés principaux.

20 Le composé 1 correspond de par son volume d'élution sur Biogel P2 et sa migration sur couche mince au lacto-*N*-néo-tétraose.

Le spectre de masse du composé 2 montre la présence d'un ion quasi-moléculaire [M+H]⁺ à m/z à 854 correspondant à la 25 masse molaire du lacto-*N*-fucopentaose. La présence d'un ion secondaire à 327 indique que la molécule est fucosylée sur le résidu glucose et possède la structure suivante



Le spectre de masse du composé 3 majoritaire montre la présence de 3 ions quasi moléculaires à m/z 1000, 1022 et 1038 correspondant aux trois formes $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ de la molécule de lacto-*N*-difucohexaose ayant la structure suivante

5 β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -(β -L-Fuc-[1 \rightarrow 3]) β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-
(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-Glc.

Le spectre de masse du composé 4 permet d'identifier deux ions quasi moléculaires à m/z 1365 et 1388 correspondant aux formes $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ d'une molécule de lacto-*N*-difucooctaoses.

10 La présence d'un ion secondaire à m/z 512 indique que le résidu GlcNAc de l'extrémité non réductrice porte un fucose. Les données de RMN montrent que le proton 1H d'un résidu fucose est sensible à l'anomérie et que ce résidu fucose est donc fixé sur le glucose. Ces résultats permettent de proposer pour le composé 4 la structure suivante :

15

β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -(α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3]) β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3] β -D-Gal-[1 \rightarrow 4] β -D-GlcNAc-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- α -L-Fuc-[1 \rightarrow 3])- β -D-Glc.

REFERENCES

1. Boons (1996) *Tetrahedron* **52**, 1095-1121.
- 5 2. Dische Z. Shettles L.B. (1948) *J. Biol. Chem.*, **175**, 160-167.
3. Donnenberg M.S., Kaper J.B. (1991) *Infect. Immun.*, **59** :4310-4317.
- 10 4. Geremia R.A., Mergaert P., Geelen D., Van Montagu M., Holsters M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2669-2673.
5. Gilbert M., Watson D.C., Cunningham A.M., Jennings M.P., Young N.M., Martin A. , Wakarchuk W.W.(1996) *J. Biol. Chem.*,
15 **271** :28271-28276.
6. Gilbert M, Watson D.C., Warachuk W.W (1997). *Biotechnology Letters*, **19**:417-420.J.
- 20 7. Gilbert M., Cunningham A.M., Watson D.C., Martin, A., Richards, J.C., Wakarchuk, W.W. (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**, 187-194.
- 25 8. Kamst E., van der Drift K.M.G., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. (1995) *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **177**, 6282-6285.
9. Kovach, M.E., Elzre, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Rarris, M.A., Roop II, R.M., Peterson, K.M., (1995). *Gene* **166**, 175-176.

10. Lee R.T., Lee Y.C. (1974). *Carbohydr. Res.* **37**, 193-203.
11. Martin, S.L., Edbrooke, M.R., Hodgman, T.C., van den Eijnden,
5 D.H, Bird, M.I., (1997) *J. Biol. Chem.*, **34**, 21349-21356.
12. Mergaert P., D'Haeze W., Geelen D., Promé D. Van Montagu M.,
Geremia R., Promé J.C., Holsters M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**,
29217-29223.
13. Plumbridge J., Vimr E. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**:47-54.
14. Reissig, J.L., Strominger, J. L., Leloir, L.F., (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.
15. Roy R (1997) Recent developments in the rational design of multivalent glycoconjugates, in Topics curr chem., (eds J.Thiem and H. Driguez), Springer, Heidelberg, pp 241-274.
- 20 16. Russo T.A., Singh G. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 7617-7623.
17. Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H., Geremia, R.A. (1997). *Carbohydr. Res.* **30**, 235-242.
- 25 18. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press. N.Y.

19. Spaink H.P., Wijfjes A.H.M., van der Drift K.M.G., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J. (1994) *Mol. Microbiol.* **13**, 821-831.
- 5 20. Stevenson G., Andrianopoulos K., Hobbs M. , P.R. Reeves P.R. (1996) *J. Bacteriol.*, **178** :4885-4893.
21. Stout V., Torres-Cabassa A., Maurizi M.R., Gutnick D., Gottesman S. (1991) *J. Bacteriol.*, **173** :1738-1747.
- 10 22. Yannisch-Perron C., Viera J., Messing J. (1985). *Gene*, **33**, 103-119.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'un oligosaccharide d'intérêt par une cellule génétiquement modifiée à partir d'au moins un précurseur exogène internalisé, ledit précurseur intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit procédé comprenant les étapes de :

i) Obtention d'une cellule qui :

- comprend au moins un gène recombinant codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification dudit précurseur exogène ou de l'un des intermédiaires de la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur exogène, nécessaire à la synthèse dudit oligosaccharide à partir dudit précurseur, ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène dans ladite cellule,
- est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit oligosaccharide, ledit précurseur et lesdits intermédiaires ;

ii) Mise en culture de ladite cellule en présence d'au moins undit précurseur exogène, dans des conditions permettant l'internalisation selon un mécanisme de transport passif et/ou selon un mécanisme de transport actif dudit précurseur exogène par ladite cellule et la production dudit oligosaccharide par ladite cellule.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite cellule comprend en outre au moins un gène codant pour un enzyme capable d'effectuer une modification d'un précurseur endogène intervenant dans la voie de biosynthèse dudit oligosaccharide, ledit enzyme étant identique ou différent de l'enzyme selon la revendication 1, ainsi que les éléments permettant

l'expression dudit gène dans ladite cellule et caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur.

3. Procédé selon les revendications 1 et 2 caractérisé en ce que ladite cellule est une cellule choisie parmi les bactéries et les levures.

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que la cellule est une bactérie, de préférence de type *Escherichia coli*.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que ladite modification est choisie parmi la glycosylation, la sulfatation, l'acétylation, la phosphorylation, la succinylation, la méthylation, l'addition d'un groupement énolpyruvate.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que ledit enzyme est un enzyme capable d'effectuer une glycosylation choisi parmi les glycosyl-transférases.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que ledit enzyme est une glycosyl-transférase choisie parmi la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase, la β -1,3 galactosyl-transférase, l' α -1,3 N-acétyl-galactosaminyl-transférase, la β -1,3 glucuronosyl-transférase, la β -1,3 N-acétyl-galactosaminyl-transférase, la β -1,4 N-acétyl-galactosaminyl-transférase, la β -1,4-galactosyl-transférase, l' α -1,3-galactosyl transférase, l' α -1,4-galactosyl-transférase, l' α -2,3-sialyl-transférase, l' α -2,6-sialyl-transférase, l' α -2,8-sialyl-transférase, l' α -1,2-fucosyl-transférase, l' α -1,3-fucosyl-transférase, l' α -1,4-fucosyl-transférase.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que ladite mise en culture cellulaire est effectuée sur un substrat carboné.

9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que ledit substrat carboné est choisi parmi le glycérol et le glucose.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9 caractérisé en ce que ladite mise en culture est effectuée dans des conditions 5 permettant l'obtention d'une culture à haute densité cellulaire.

11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que ladite étape de mise en culture comprend :

- a)- une première phase de croissance cellulaire exponentielle assurée par ledit substrat carboné;
- 10 b)- une seconde phase de croissance cellulaire limitée par ledit substrat carboné qui est ajouté de manière continue ;
- c)- une troisième phase de croissance cellulaire ralentie obtenue en ajoutant de manière continue dans la culture une quantité dudit substrat diminuée par rapport à la quantité de substrat ajoutée à l'étape b) de façon à augmenter la teneur 15 en oligosaccharides produits dans la culture à haute densité cellulaire.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que la quantité de substrat ajouté de manière continue dans la culture cellulaire au cours de ladite phase c) est diminuée d'au moins 30%, 20 de préférence 50%, de manière préférée 60% par rapport à la quantité de substrat ajouté de manière continue lors de ladite phase b).

13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12 25 caractérisé en ce que ledit précurseur est ajouté lors de la phase b).

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que ledit précurseur est de nature glucidique, de préférence de nature oligosaccharidique.

15. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit précurseur est un monosaccharide dont le carbone anomère est lié à un groupement alkyl de manière à permettre son internalisation par un mécanisme de transport passif.

5 16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que ledit groupement alkyl est un allyl.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 et 16 pour la production du [β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]- β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl] caractérisé en ce que :

10 • ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ* ;
• ledit enzyme est la β -1,4-galactosyl-transférase ;
• ledit substrat est le glycérol ;
• ledit précurseur est l'allyl-N-acétyl β -D-glucosaminide (β -D-GlcNac-1 \rightarrow O-allyl).

15 18. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit précurseur est le lactose.

19. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit précurseur est choisi dans le groupe composé :

20 • de β -galactosides naturels ou synthétiques, de préférence dans le 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose (lactulose), le 3-O- β -D-galacto-pyranosyl-D-arabinose, l'allyl- β -D-galactopyranoside ;
• d' α -galactosides, de préférence le mélibiose, le raffinose, l'allyl- α -D-galactopyranoside ;
25 • de saccharose.

20. Procédé selon les revendications 18 et 19 caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose perméase.

21. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit précurseur est l'acide sialique.

22. Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la perméase 5 Nan T.

23. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que ledit précurseur est l'acide sialique et le lactose.

24. Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que ledit transport actif dudit précurseur est réalisé par la lactose 10 perméase et la perméase Nan T.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 caractérisé en ce que ladite cellule est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit précurseur ou lesdits précurseurs.

15 26. Procédé selon la revendication 25 caractérisé en ce que ladite cellule a un génotype choisi parmi *LacZ*- et/ou *Nan A*-.

27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'addition d'un inducteur dans ledit milieu de culture pour induire l'expression dans ladite 20 cellule dudit enzyme et/ou d'une protéine impliquée dans ledit transport actif.

28. Procédé selon la revendication 27 caractérisé en ce que ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) et ladite protéine est la lactose perméase.

25 29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour la production du trisaccharide 4-O-[3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl]-D-glucopyranose, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-[1 \rightarrow 4]-D-Glc) caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+

- ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase ;
- ledit substrat est le glycérol ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- ledit précurseur est le lactose.

5 30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour la production du lacto-N-néo-tétraose et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+
- 10 • lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase ;
- ledit substrat est le glucose ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- ledit précurseur est le lactose.

15 31. Procédé selon la revendication 30 pour la production d'un dérivé sialylé du lacto-N-néotétraose et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi l' α -2,3 sialyl-transférase, l' α -2,6 sialyl-transférase, et que 20 ladite cellule a en outre un génotype *NanA*-, *NanT* et exprime le gène de la CMP-NeuAc-synthase.

32. Procédé selon la revendication 30 pour la production d'un dérivé fucosylé du lacto-N-néotétraose et de polylactosamine (lacto-N-néo-hexaose, lacto-N-néo-octaose, lacto-N-néo-décaose) 25 caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi l' α -1,2 fucosyl-transférase, l' α -1,3 fucosyl-transférase, et que ladite cellule a en outre un génotype *Wca J* et surexprime le gène *Rcs A*.

33. Procédé selon la revendication 30 pour la production d'un dérivé sialylé et fucosylé du lacto-N-néotétraose, lacto-N-néo-décaose caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dit enzyme choisi parmi le l'α-2,3 sialyl-transférase, l'α-2,6 sialyl-transférase, 5 et en outre un dit enzyme choisi parmi l'α-1,2 fucosyl-transférase, l'α-1,3 fucosyl-transférase, et que ladite cellule a en outre un génotype *NanA*-, *Nan T*+, *Wca J* et surexprime le gène *Rcs A* et le gène de la CMP-NeuAc-synthase.

34. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 10 pour la production du 3'-sialyllactose (α -NeuAc-[2→3]- β -D-Gal-[1→4]- β -D-Glc) ou du 6'-sialyllactose (α -NeuAc-[2→6]- β -D-Gal-[1→4]- β -D-Glc) caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+, *Nan A*-, *Nan T*+
- 15 lesdits enzymes sont la CMP-NeuAc-synthase et l'α-2,3 sialyl-transférase ou l'α-2,6 sialyl-transférase;
- ledit substrat est le glycérol ;
- ledit inducteur est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- 20 lesdits précurseurs sont le lactose et l'acide sialique.

35. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour la production de 3'fucosyllactose β -D-Gal-[1→4]-(α -L-Fuc-[1→3])-D-Glc ou de 2'fucosyllactose α -L-Fuc-[1→2]- β -D-Gal-[1→4]-D-Glc caractérisé en ce qu'il comprend un dit enzyme choisi parmi l'α-1,3 fucosyltransférase ou l'α-1,2 fucosyltransférase, et que la 25 cellule a un génotype *wcaJ lacZ* et surexprime le gène *rcsA* et que ledit précurseur est le lactose.

36. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour la production de l'allyl 3-O-(2-acétamido-2déoxy- β -D-

glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside, (β -D-GlcNac-[1 \rightarrow 3]- β -D-Gal-1 \rightarrow O-allyl) caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+
- ledit enzyme est la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase ;
- 5 • ledit substrat est le glycérol ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

37. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour la production d'analogues du lacto-N-néo-tétraose et de 10 polylactosamines dans lesquels le résidu glucose est remplacé par un groupement allyl caractérisé en ce que :

- ladite cellule est une bactérie de génotype *LacZ*, *LacY*+
- lesdits enzymes sont la β -1,3-N-acétyl-glucosaminyl-transférase et la β -1,4-galactosyl-transférase ;
- 15 • ledit substrat est le glucose ;
- ledit inducteur est l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) ;
- ledit précurseur est l'allyl- β -D-galactopyranoside.

38. Procédé selon l'une des revendications 31 à 35 pour la production d'analogue d'oligosaccharides dans lesquels le résidu 20 glucose est remplacé par un groupement allyl caractérisé en ce que ledit précurseur est l'allyl- β -D galactoside.

39. Procédé selon les revendications 1 à 38 de production 25 d'oligosaccharide marqué par au moins un isotope caractérisé en ce que ladite cellule est cultivée sur ledit substrat carboné marqué par ledit isotope et/ou en présence d'un dit précurseur marqué par ledit isotope.

40. Oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 39.

41. Oligosaccharide susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 17, 19, 36 et 37, caractérisé en ce que la double liaison du groupement allyl dudit oligosaccharide est modifiée chimiquement par les réactions 5 d'addition, d'oxydation ou d'ozonolyse pour former des oligosaccharides activés utilisables pour la synthèse chimique de glycoconjugués ou de glycopolymères.

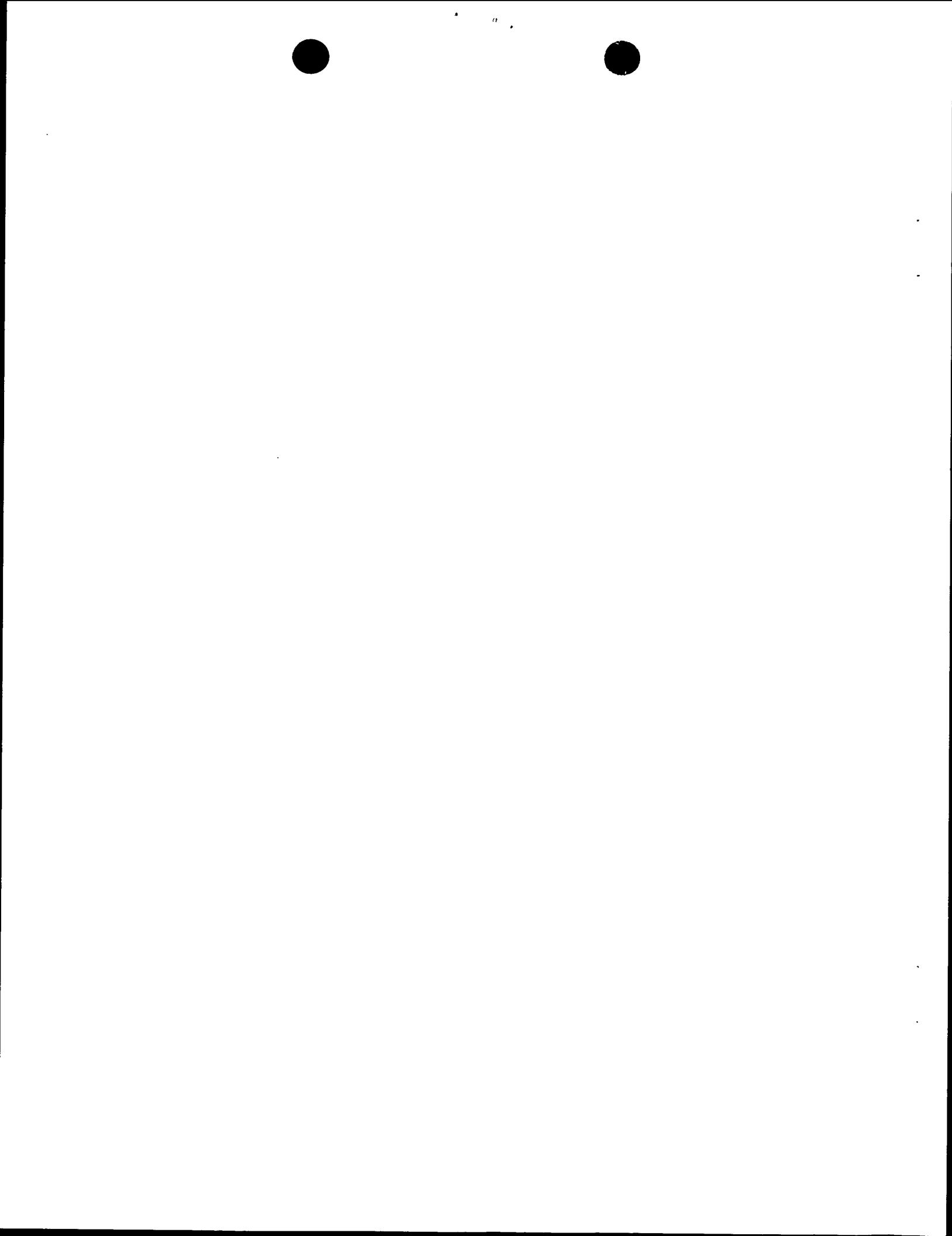
42. Oligosaccharide selon la revendication 40 ou 41 à titre de médicament.

10 43. Oligosaccharide selon la revendication 42 à titre de médicament destiné à empêcher sélectivement l'adhésion de molécules biologiques.

15 44. Oligosaccharide selon la revendication 42 à titre de médicament destiné au traitement du cancer, de l'inflammation, des maladies cardiaques, du diabète, des infections bactériennes, des infections virales, des maladies neurologiques, des greffes.

20 45. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un oligosaccharide selon l'une quelconque des revendications 42 à 44 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

46. Utilisation d'un oligosaccharide selon la revendication 40 ou 41 dans l'agriculture et l'agronomie notamment pour la croissance et la défense des végétaux.



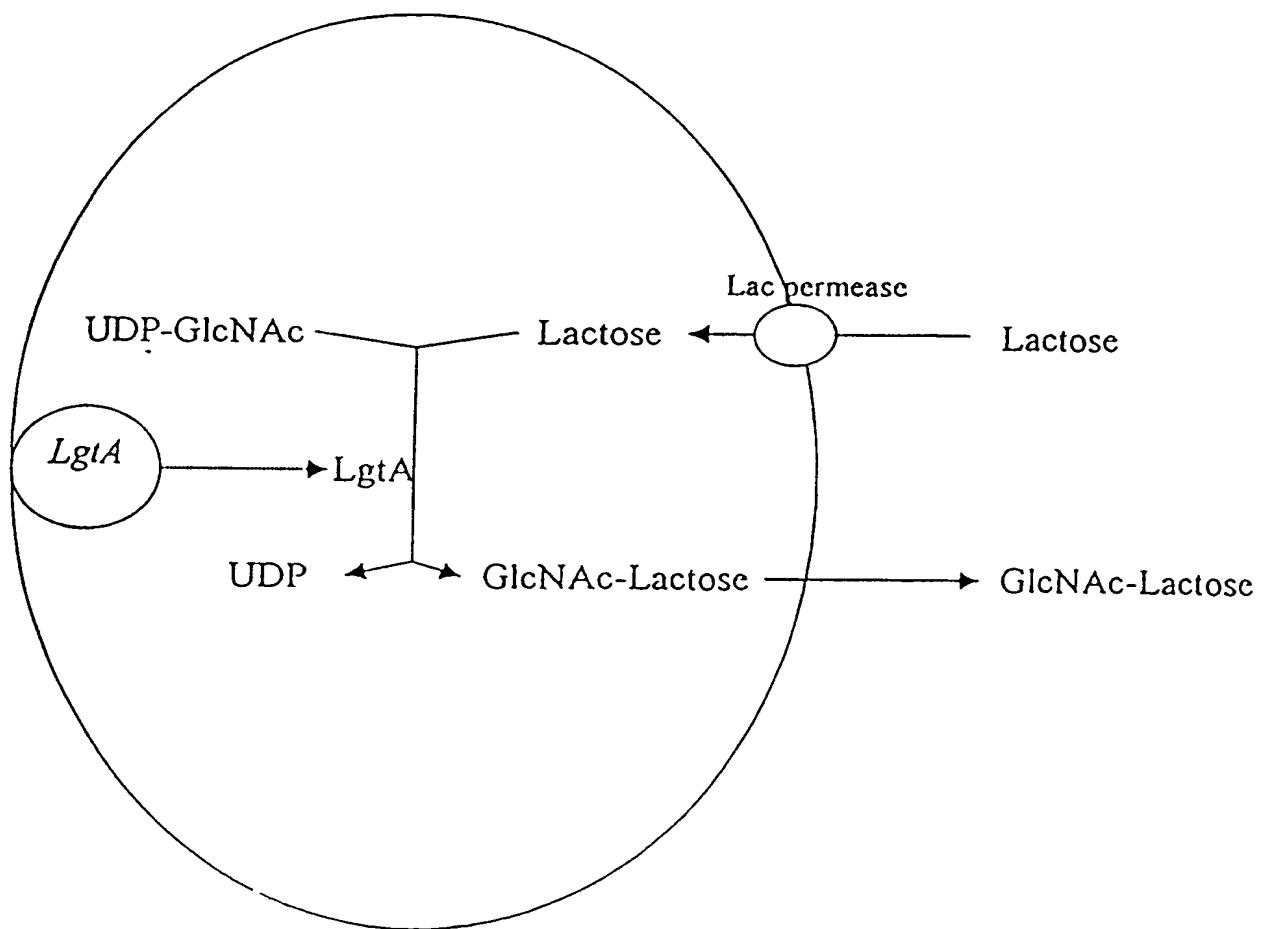


FIG-1



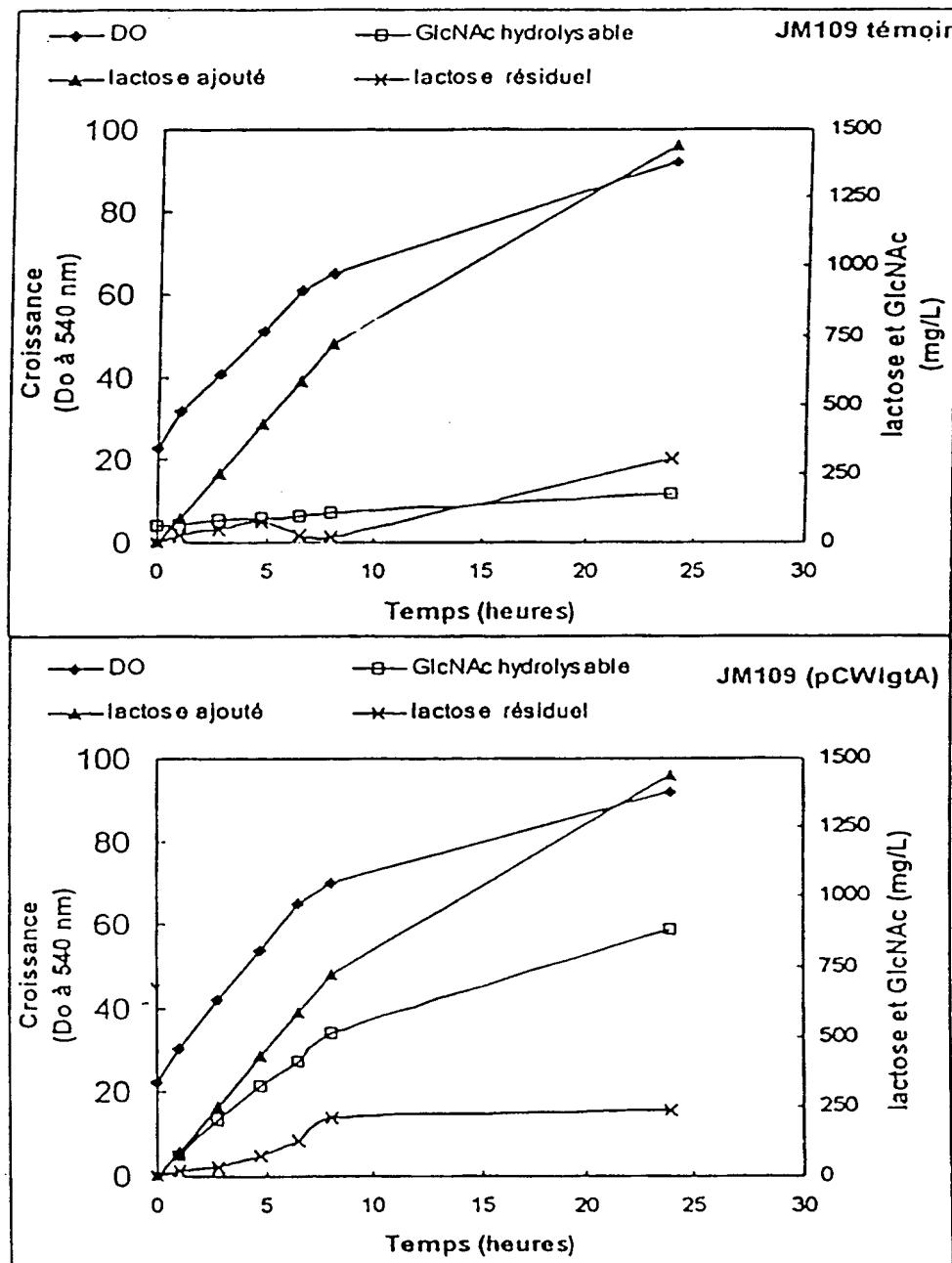
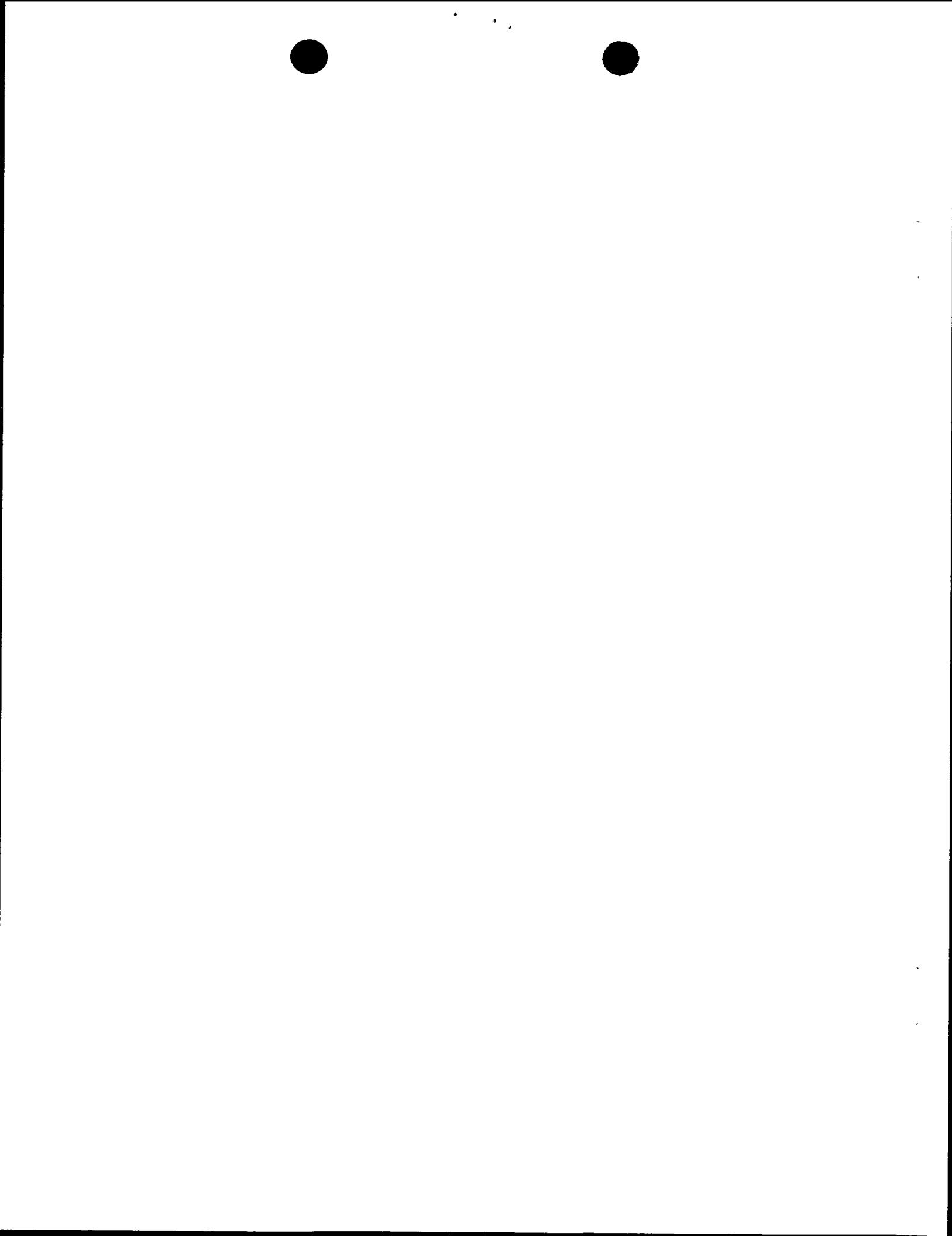


FIG-2



3 / 9

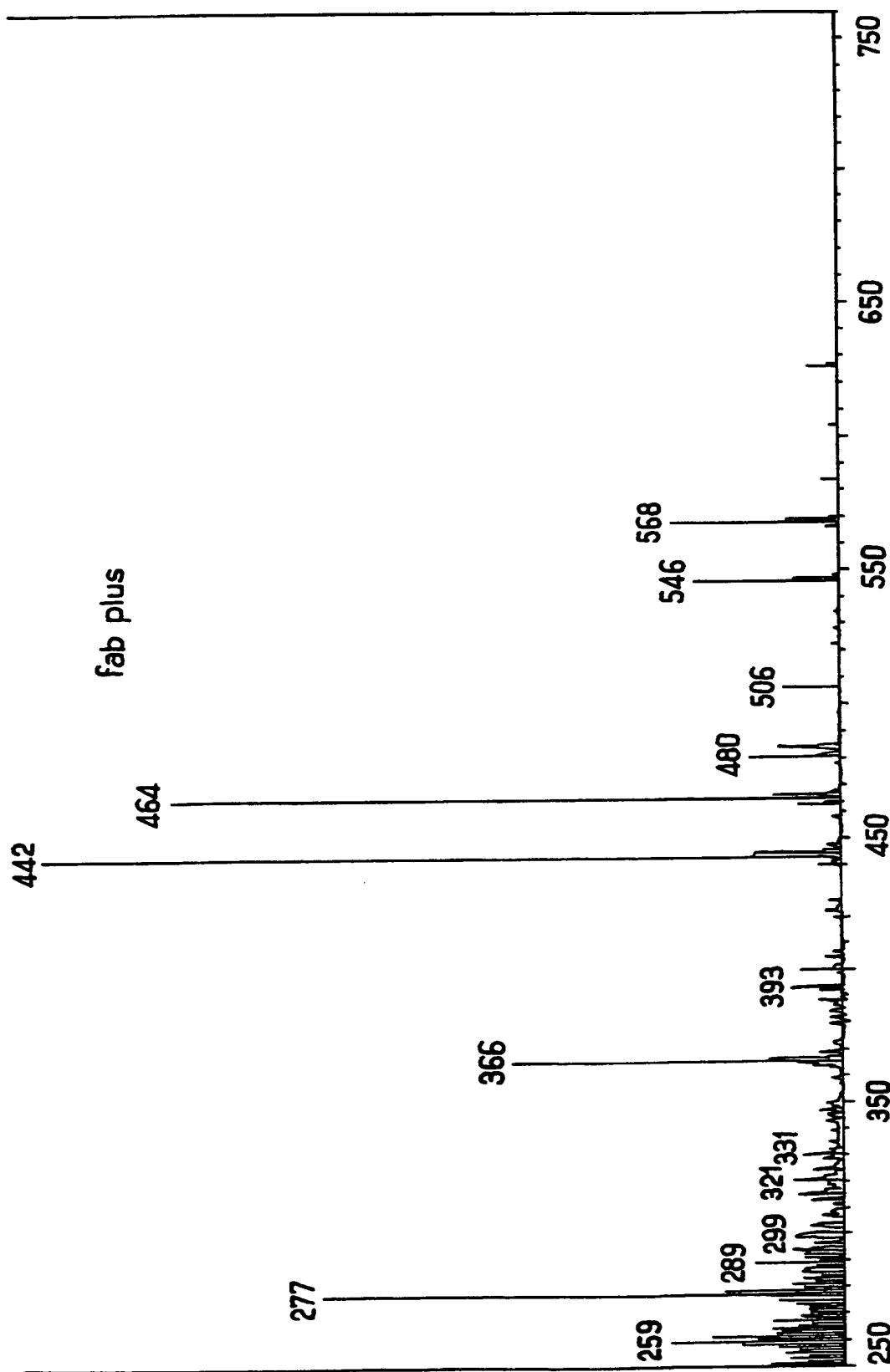


FIG. 3



4 / 9

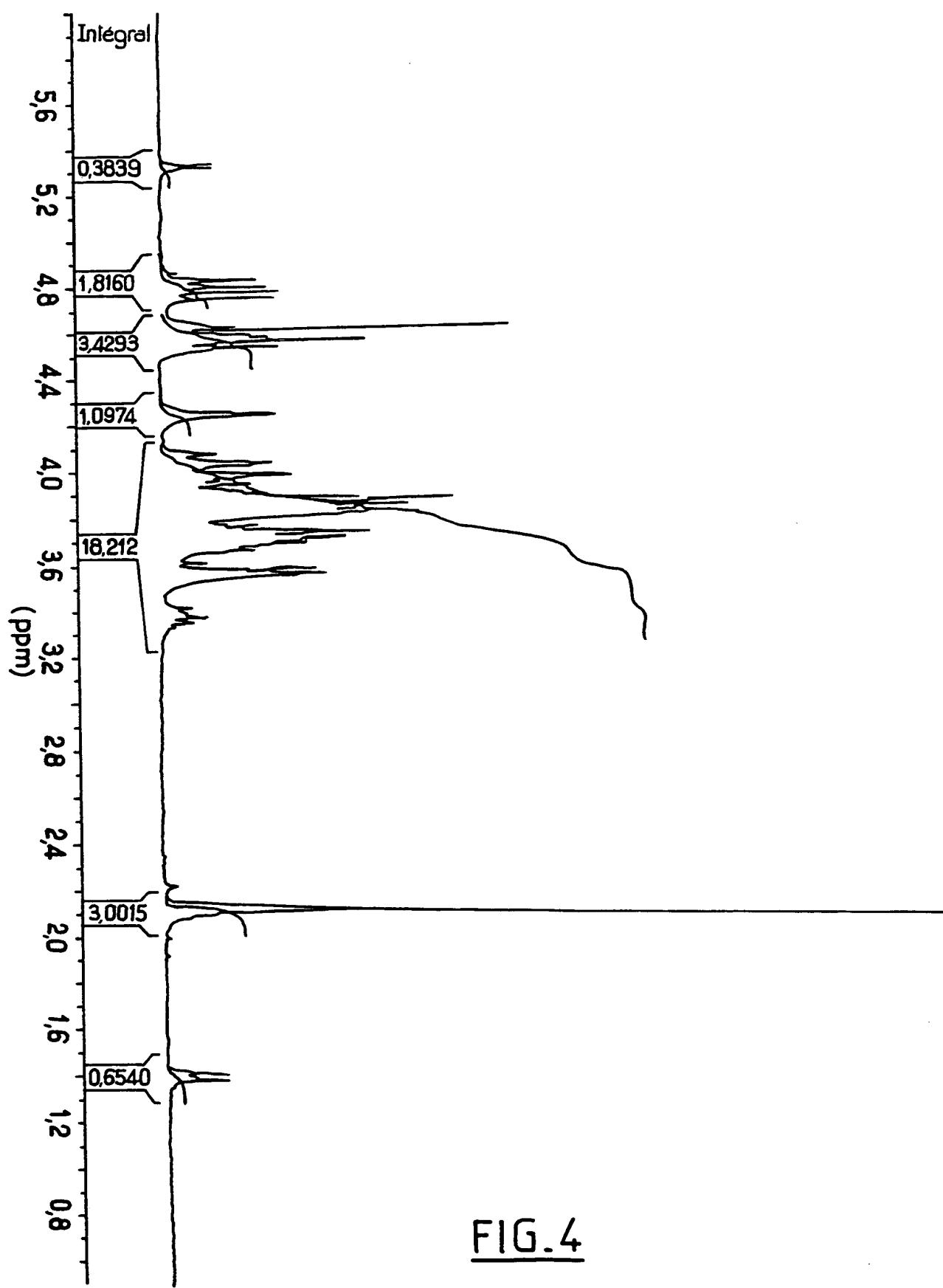
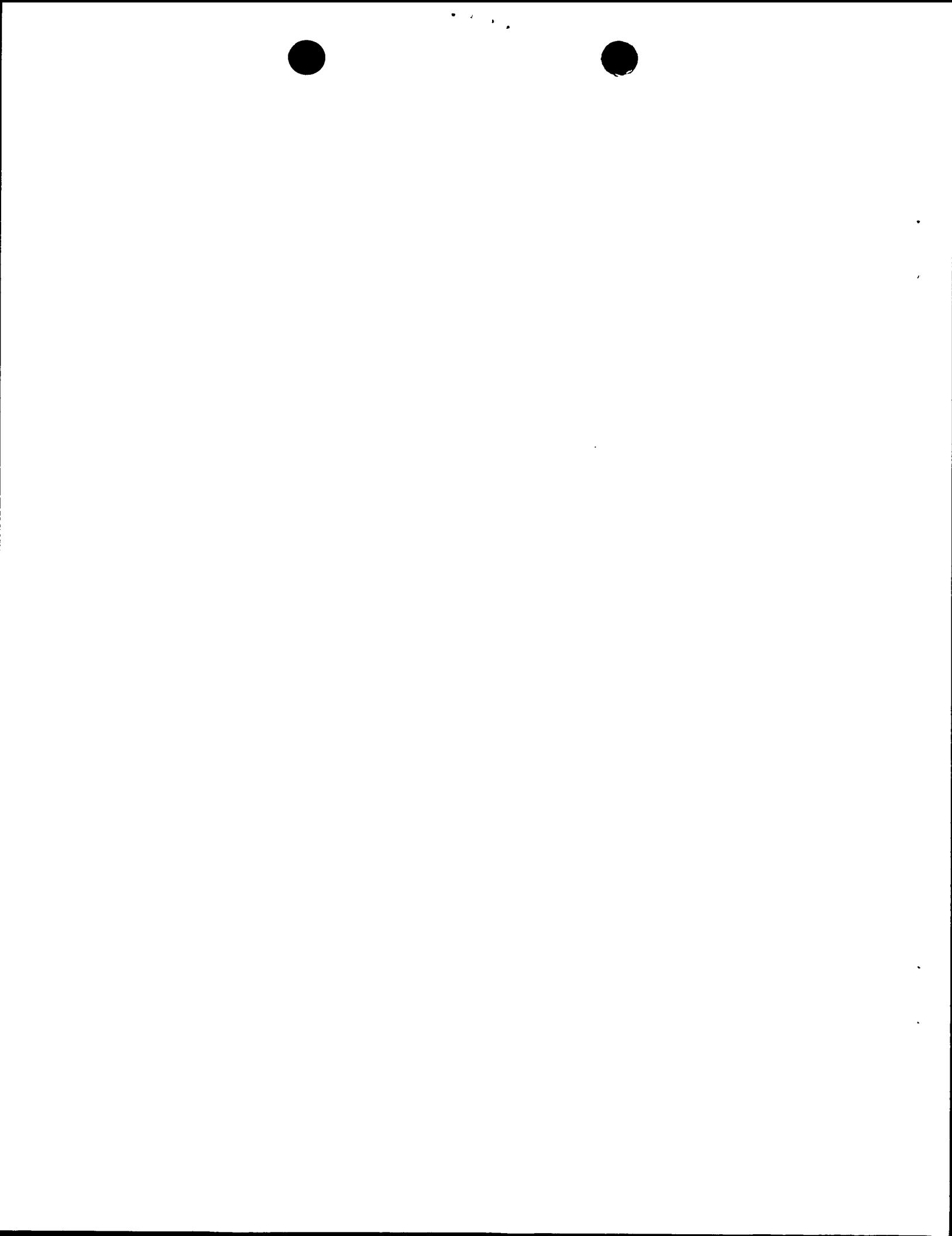


FIG.4



5 / 9

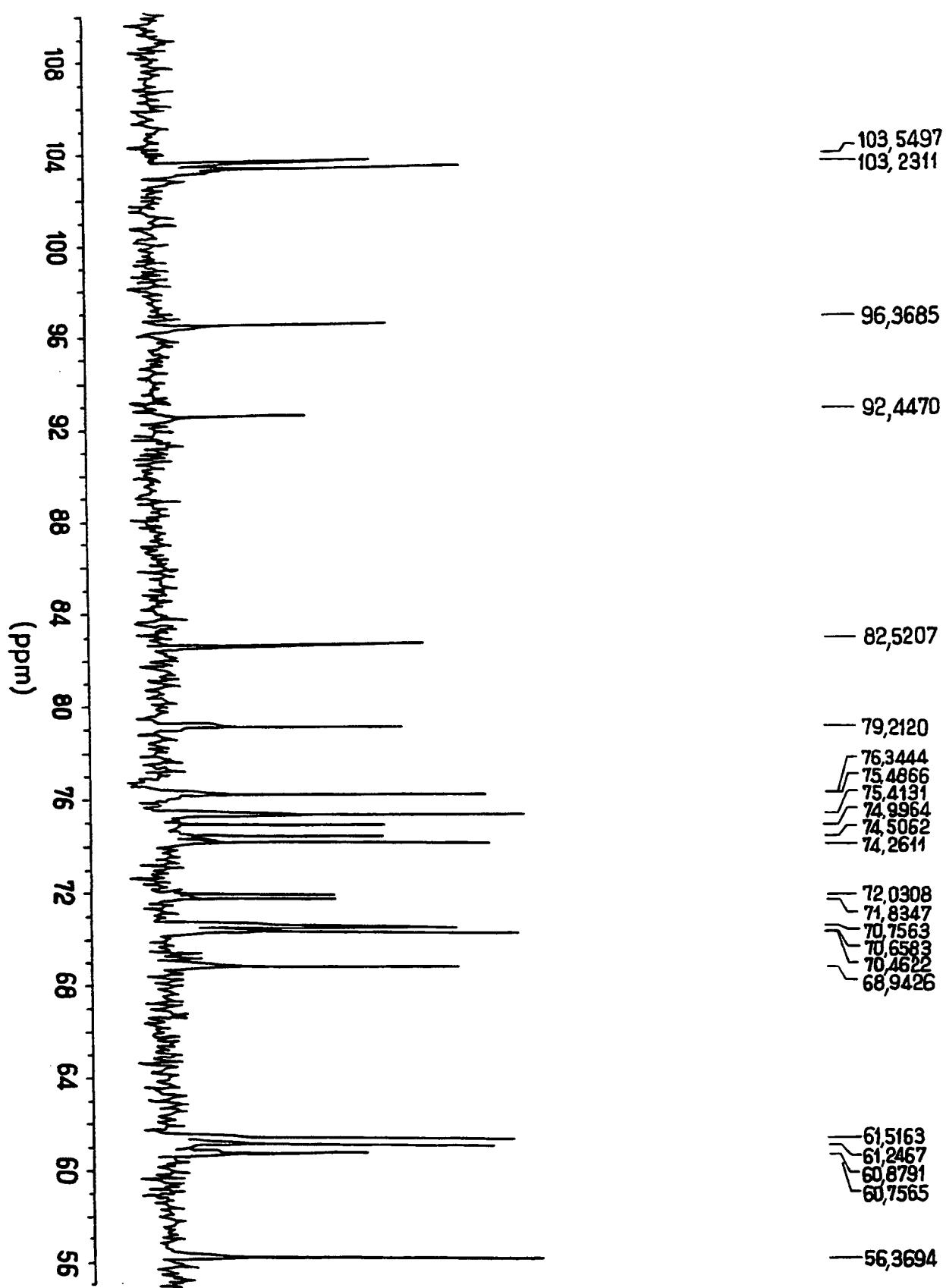
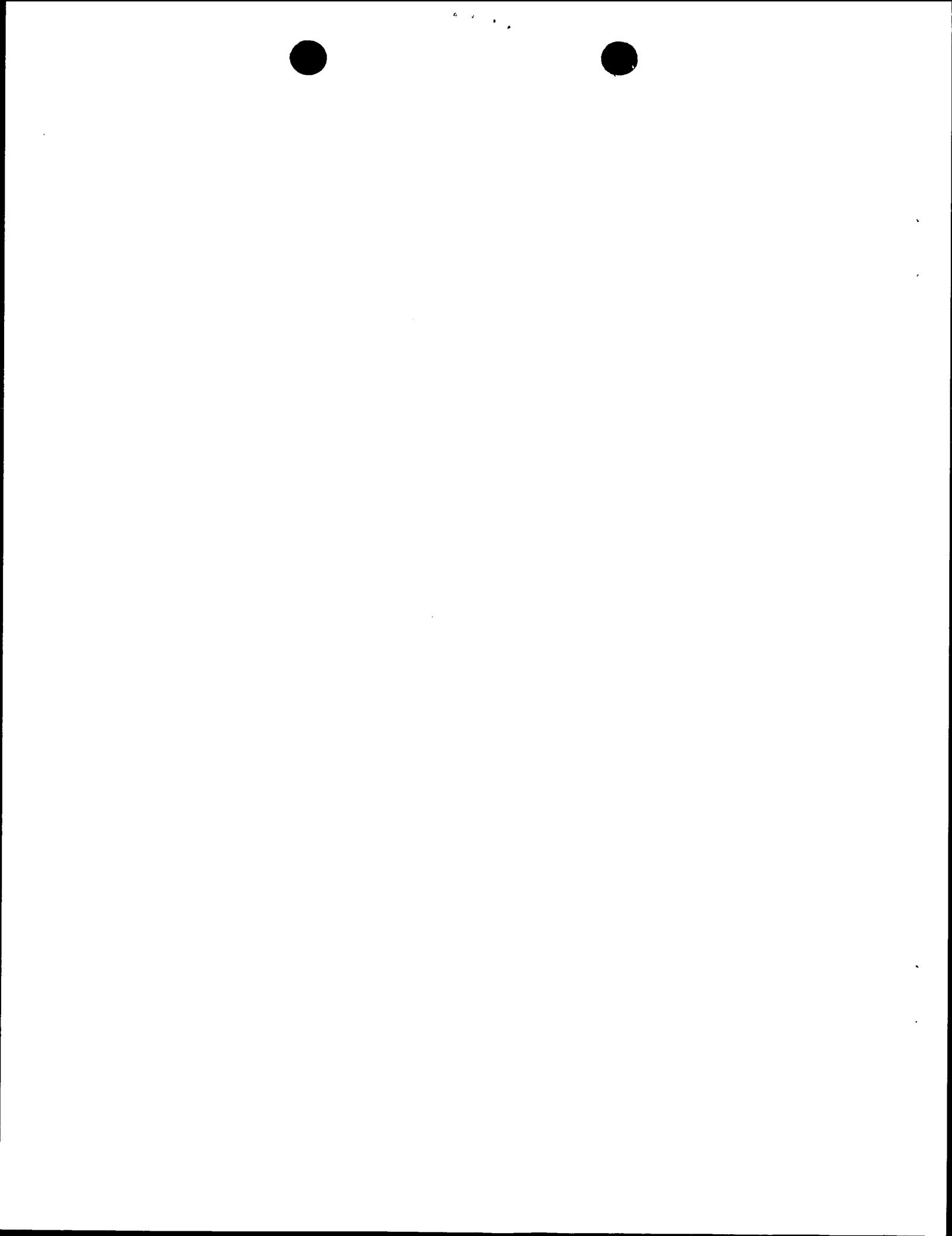


FIG. 5



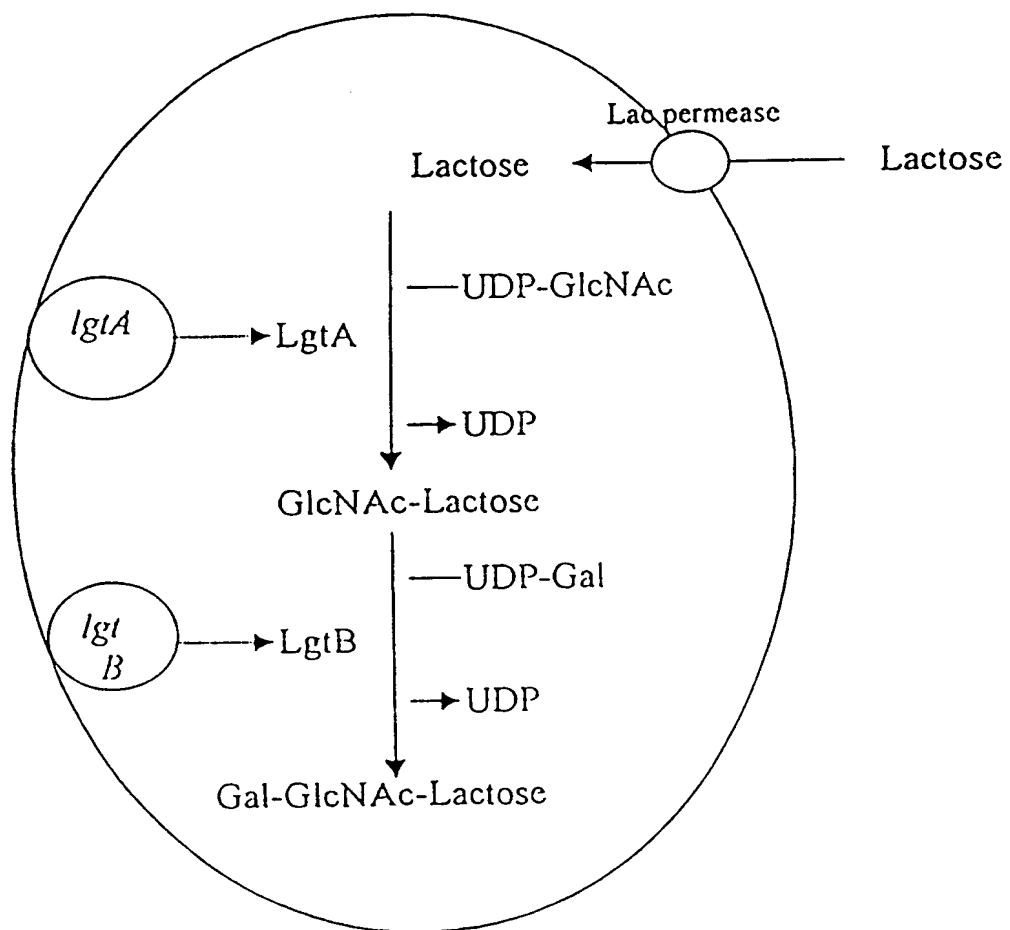
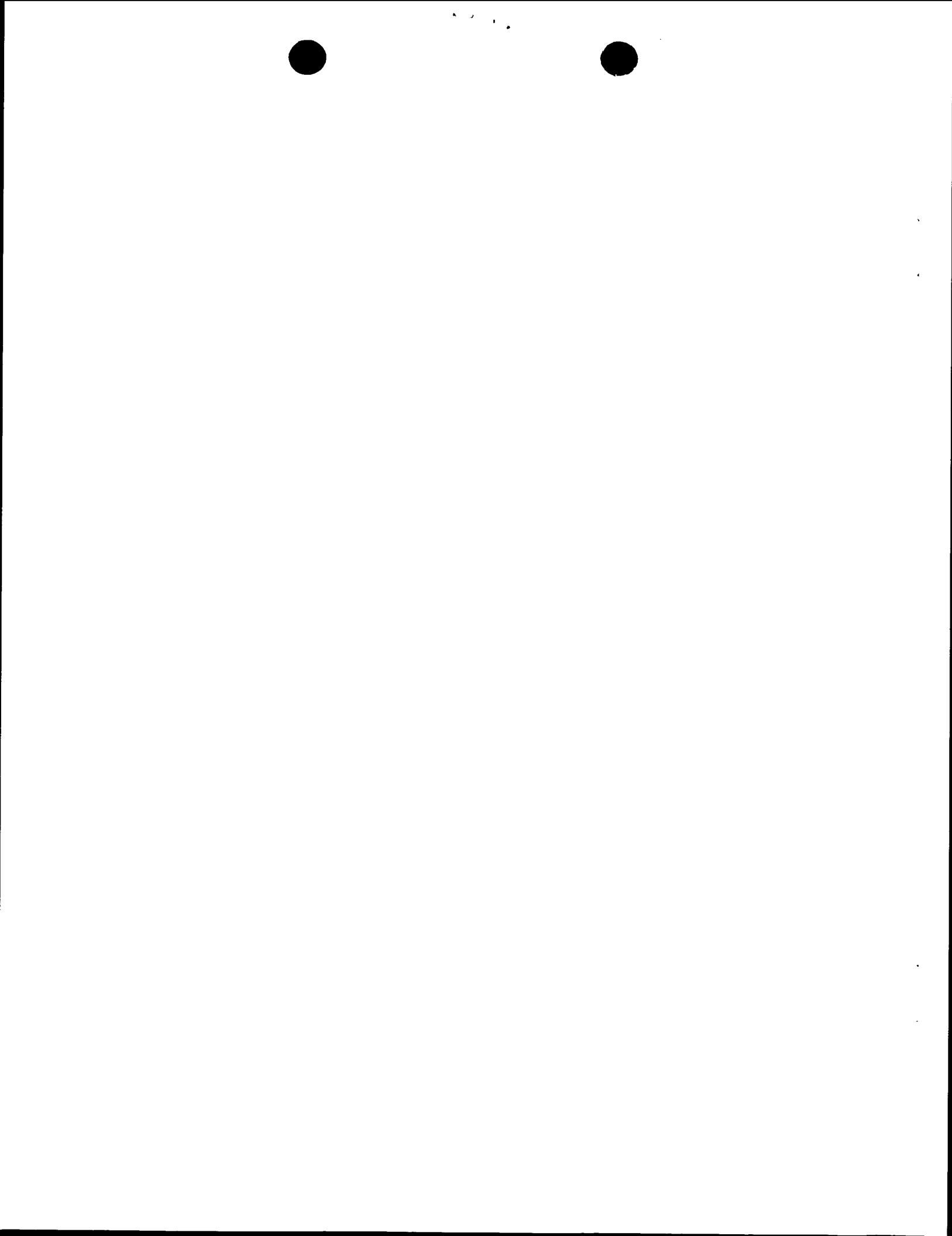


FIG-6



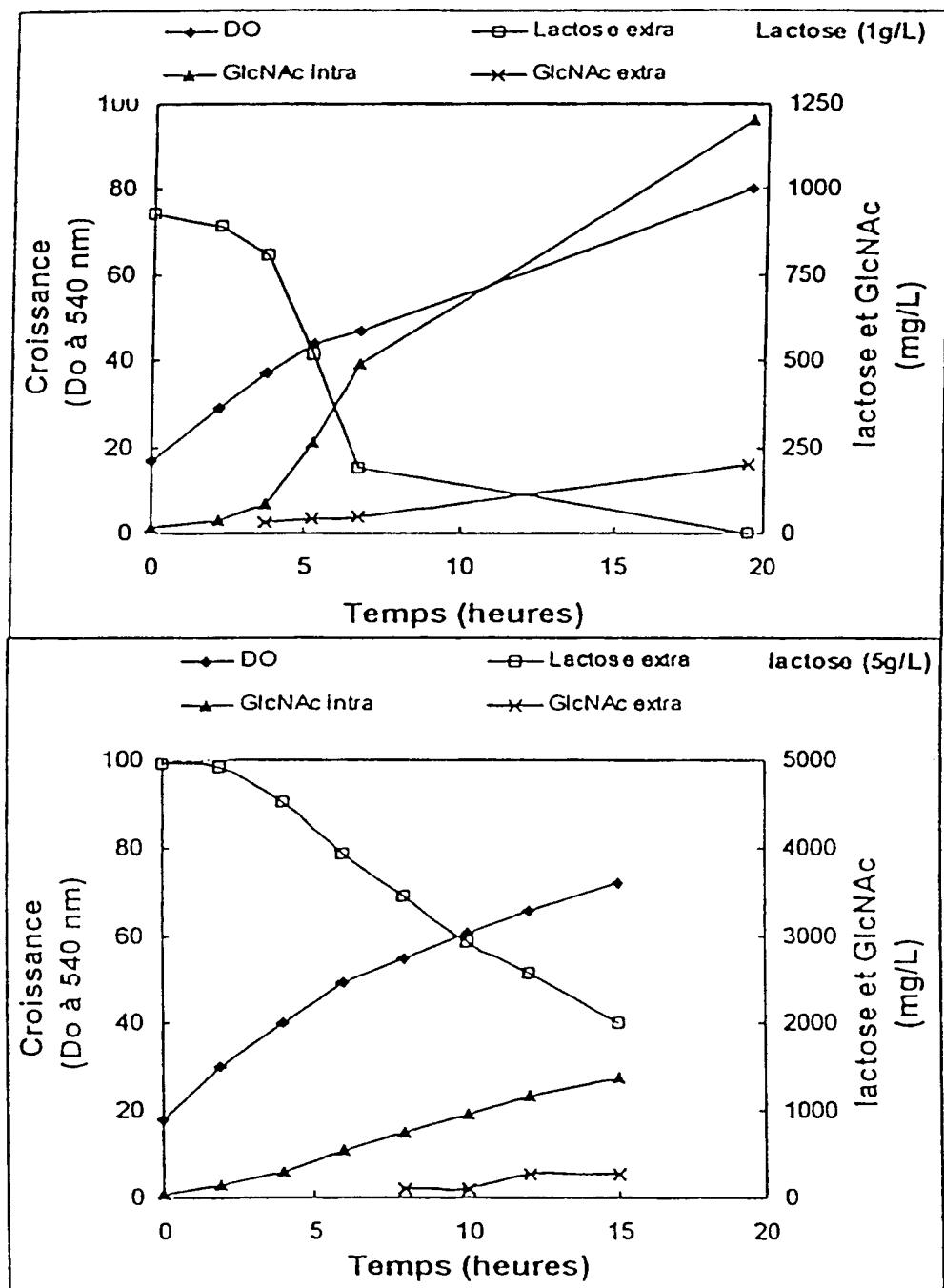
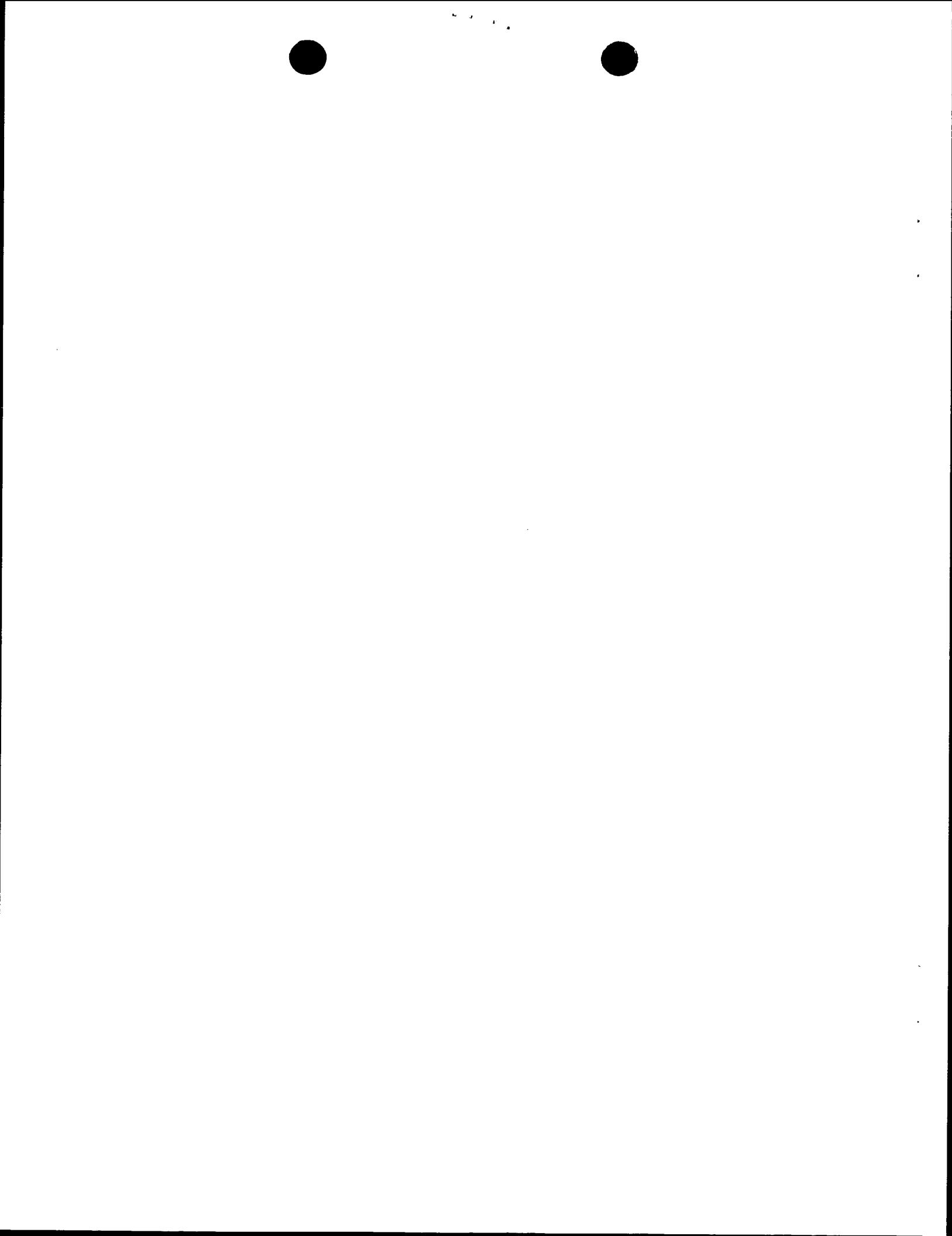


FIG-7



8 / 9

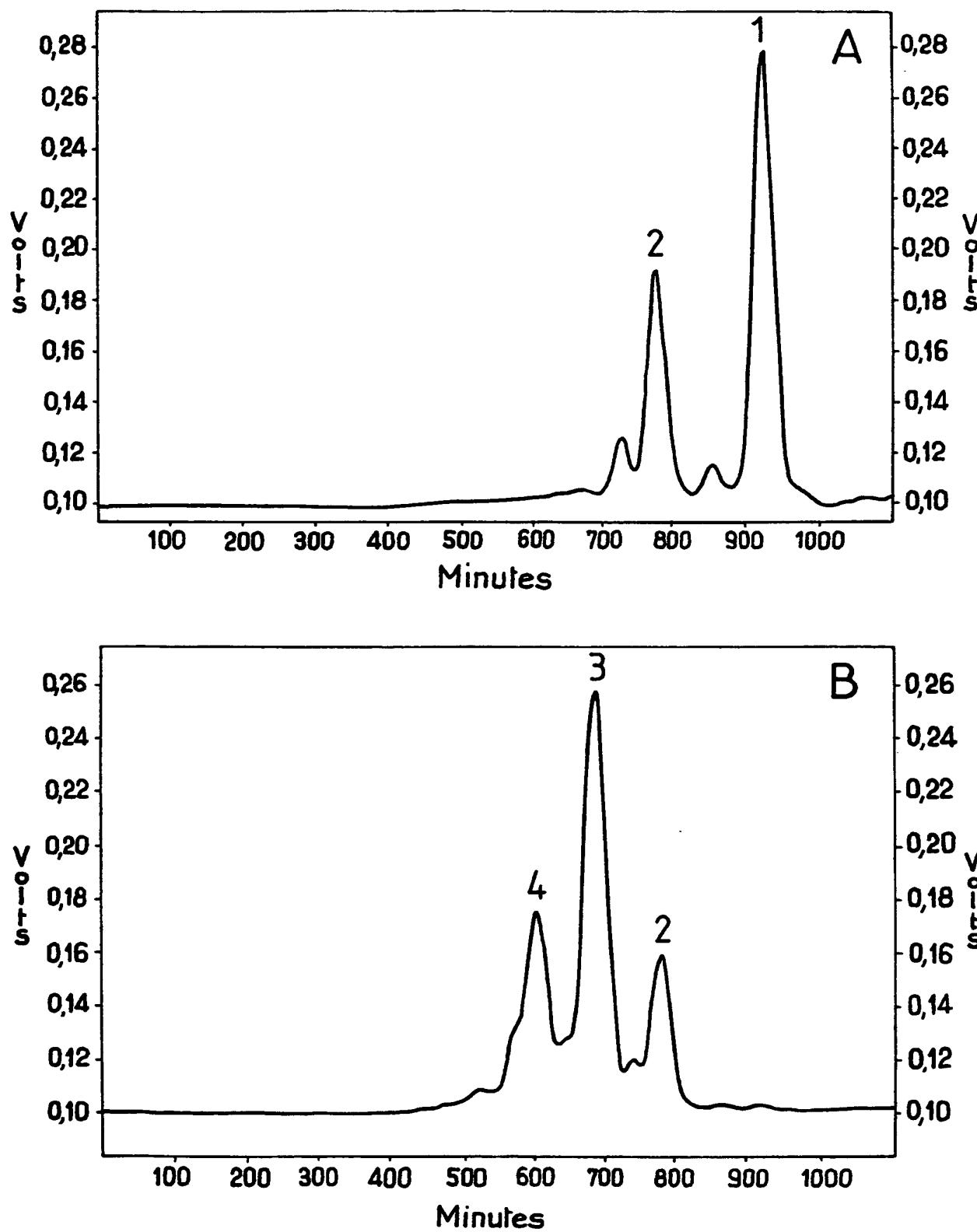
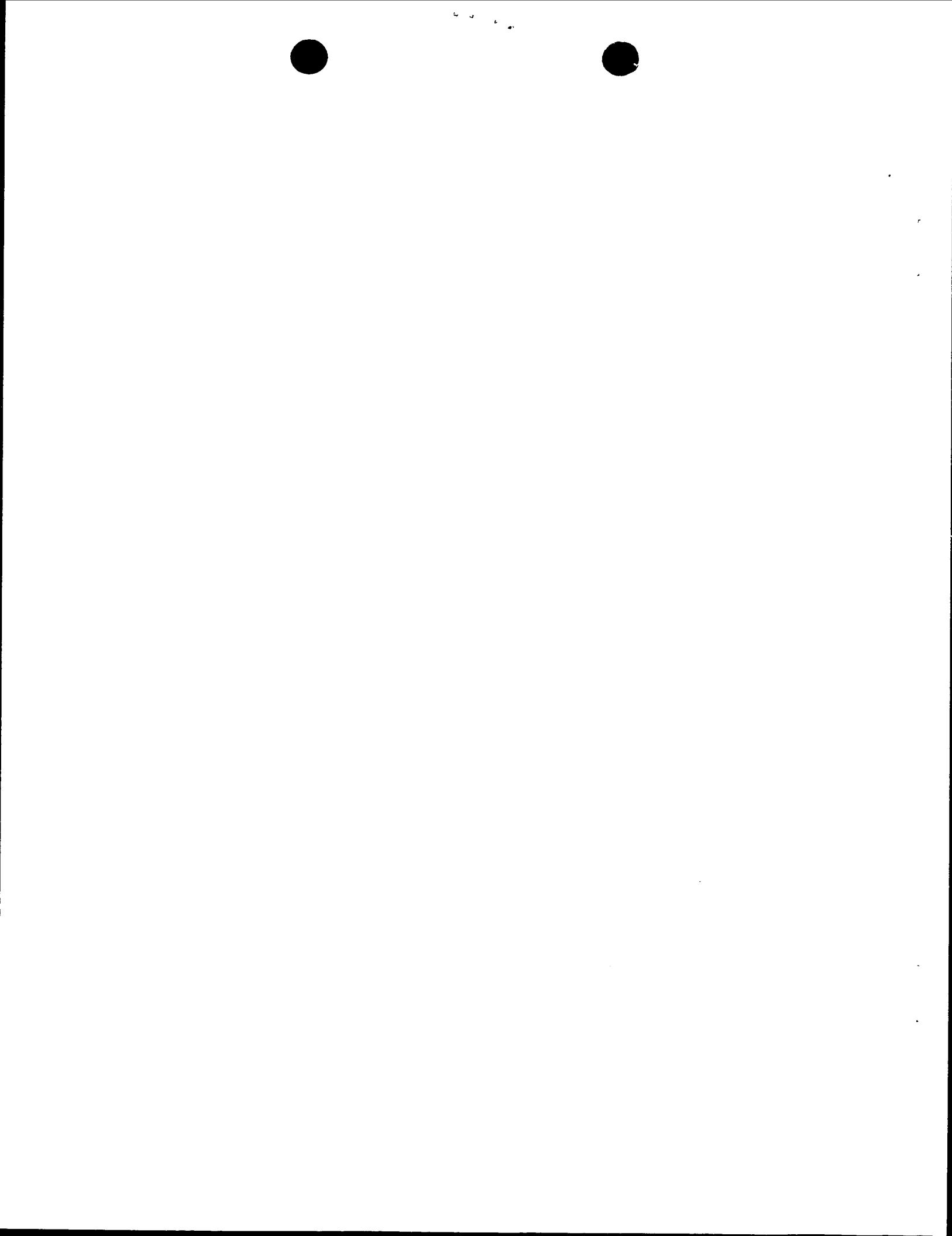


FIG. 8



9 / 9

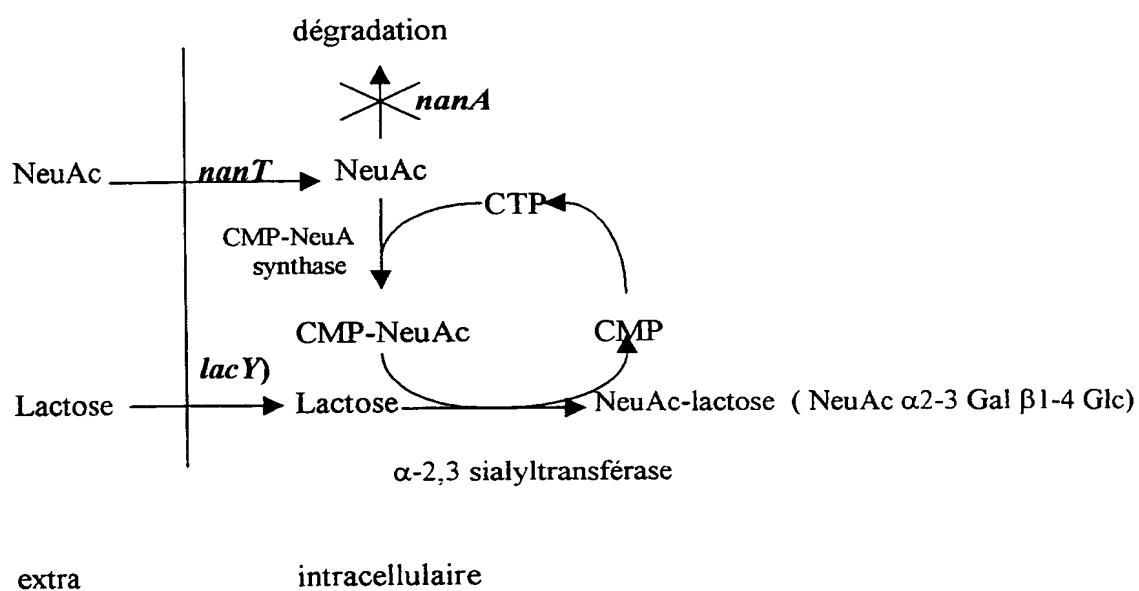
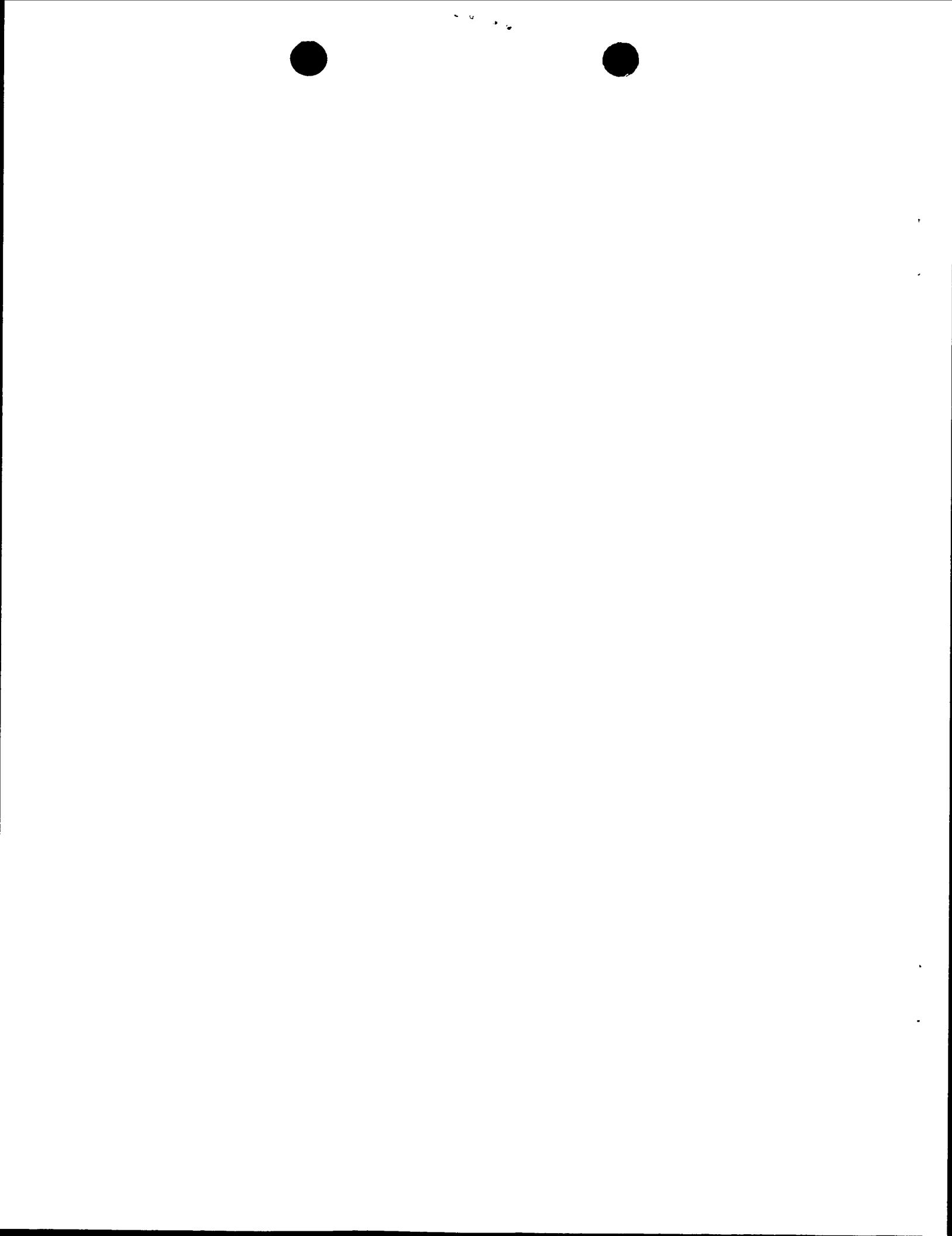


FIG-9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr Application No
PCT/FR 00/01972A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/18 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category [°]	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 35 994 A (PIEPERSBERG WOLFGANG PROF DR) 25 February 1999 (1999-02-25) claim 13; example 18 ---	1-10, 40
X	EP 0 392 556 A (MEITO SANGYO KK) 17 October 1990 (1990-10-17) abstract examples 1-4 ---	1-3, 6, 8, 14, 40
X	EP 0 315 496 A (SGN SOC GEN TECH NOUVELLE) 10 May 1989 (1989-05-10) the whole document ---	1, 2, 14, 40 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

30 November 2000

08/12/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Applicant Application No
PCT/FR 00/01972

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

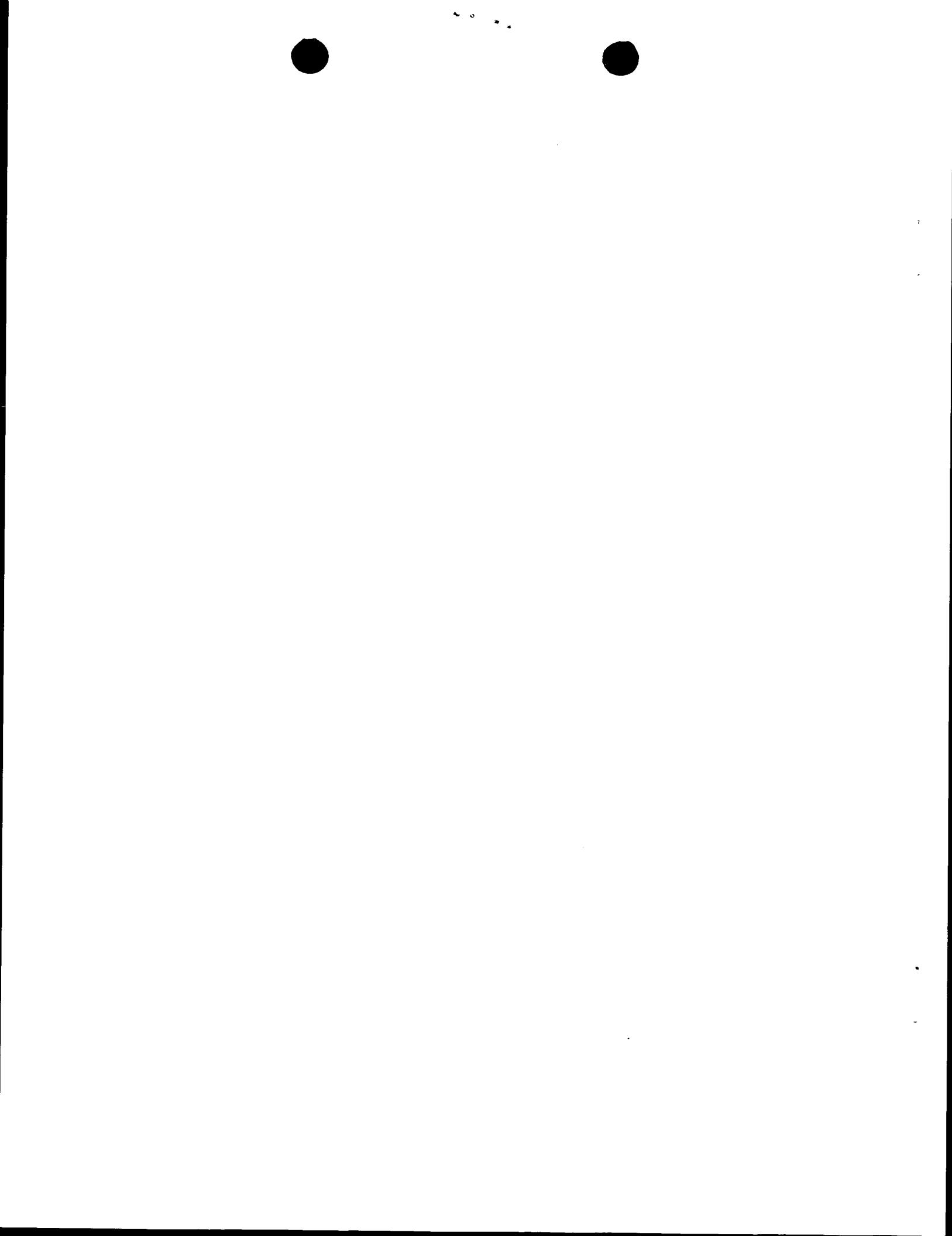
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BETTLER E ET AL: "The living factory: in vivo production of N-acetyllactosamine containing carbohydrates in <i>E. coli</i> " <i>GLYCOCOCONJUGATE JOURNAL</i> ., vol. 16, March 1999 (1999-03), pages 205-212, XP002134857 CHAPMAN & HALL., GB ISSN: 0282-0080 the whole document ---	1-46
A	SAMAIN E ET AL: "Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant <i>Escherichia coli</i> strains harboring different combinations of nod genes" <i>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY</i> , NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 72, no. 1-2, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 33-47, XP004172885 ISSN: 0168-1656 the whole document ---	1-46
A	WO 98 44145 A (ABBOTT LAB) 8 October 1998 (1998-10-08) the whole document ---	1-3
A	WO 95 02683 A (NEOSE PHARM INC) 26 January 1995 (1995-01-26) abstract example 1 ---	1-3
A	PLUMBRIDGE JACQUELINE ET AL: "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by <i>Escherichia coli</i> ." <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i> , vol. 181, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 47-54, XP000917021 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document ---	24,31-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No
PCT/FR 00/01972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19735994 A	25-02-1999	WO EP	9909180 A 1005554 A	25-02-1999 07-06-2000
EP 0392556 A	17-10-1990	JP	2273192 A	07-11-1990
EP 0315496 A	10-05-1989	FR AT DE DE FI FR	2622598 A 94907 T 3884342 D 3884342 T 883076 A 2622598 B	05-05-1989 15-10-1993 28-10-1993 07-04-1994 30-04-1989 21-06-1991
WO 9844145 A	08-10-1998	US EP NO	5945314 A 0972068 A 994771 A	31-08-1999 19-01-2000 30-09-1999
WO 9502683 A	26-01-1995	AU AU CN EP FI JP NO US	691510 B 7329994 A 1129953 A 0785988 A 960173 A 9503905 T 960177 A 5879912 A	21-05-1998 13-02-1995 28-08-1996 30-07-1997 15-03-1996 22-04-1997 07-03-1996 09-03-1999



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01972

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P19/18 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 197 35 994 A (PIEPERSBERG WOLFGANG PROF DR) 25 février 1999 (1999-02-25) revendication 13; exemple 18 ---	1-10, 40
X	EP 0 392 556 A (MEITO SANGYO KK) 17 octobre 1990 (1990-10-17) abrégé exemples 1-4 ---	1-3, 6, 8, 14, 40
X	EP 0 315 496 A (SGN SOC GEN TECH NOUVELLE) 10 mai 1989 (1989-05-10) le document en entier ---	1, 2, 14, 40 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
30 novembre 2000	08/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Lejeune, R
---	--------------------------------------

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 00/01972

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

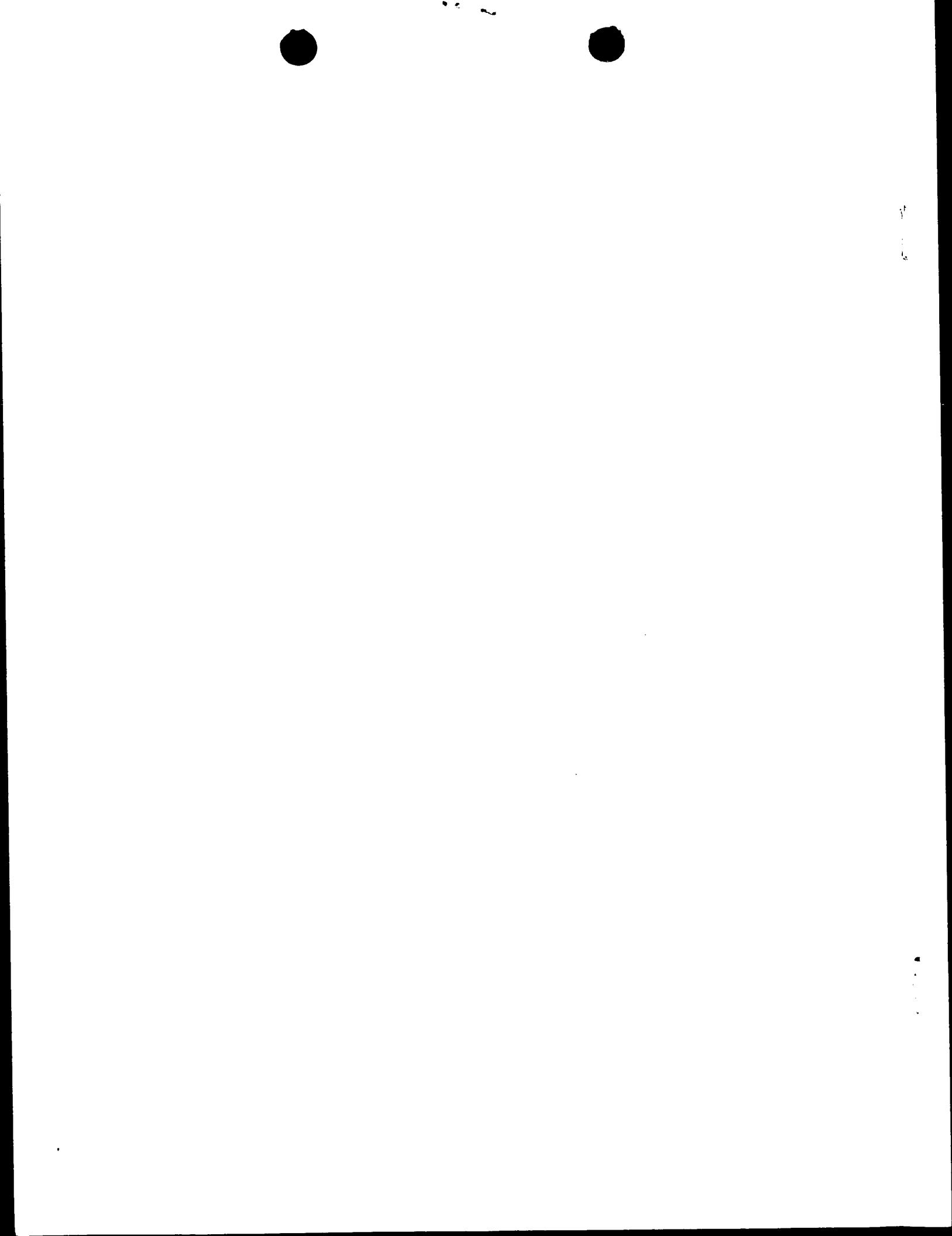
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BETTLER E ET AL: "The living factory: in vivo production of N-acetyllactosamine containing carbohydrates in <i>E. coli</i> " GLYCOCONJUGATE JOURNAL., vol. 16, mars 1999 (1999-03), pages 205-212, XP002134857 CHAPMAN & HALL., GB ISSN: 0282-0080 le document en entier ---	1-46
A	SAMAIN E ET AL: "Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant <i>Escherichia coli</i> strains harboring different combinations of nod genes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 72, no. 1-2, 11 juin 1999 (1999-06-11), pages 33-47, XP004172885 ISSN: 0168-1656 le document en entier ---	1-46
A	WO 98 44145 A (ABBOTT LAB) 8 octobre 1998 (1998-10-08) le document en entier ---	1-3
A	WO 95 02683 A (NEOSE PHARM INC) 26 janvier 1995 (1995-01-26) abrégé exemple 1 ---	1-3
A	PLUMBRIDGE JACQUELINE ET AL: "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneurameric acid by <i>Escherichia coli</i> ." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 47-54, XP000917021 ISSN: 0021-9193 cité dans la demande le document en entier ---	24, 31-34

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demr. Internationale No
PCT/FR 00/01972

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
DE 19735994 A	25-02-1999	WO EP	9909180 A 1005554 A	25-02-1999 07-06-2000
EP 0392556 A	17-10-1990	JP	2273192 A	07-11-1990
EP 0315496 A	10-05-1989	FR AT DE DE FI FR	2622598 A 94907 T 3884342 D 3884342 T 883076 A 2622598 B	05-05-1989 15-10-1993 28-10-1993 07-04-1994 30-04-1989 21-06-1991
WO 9844145 A	08-10-1998	US EP NO	5945314 A 0972068 A 994771 A	31-08-1999 19-01-2000 30-09-1999
WO 9502683 A	26-01-1995	AU AU CN EP FI JP NO US	691510 B 7329994 A 1129953 A 0785988 A 960173 A 9503905 T 960177 A 5879912 A	21-05-1998 13-02-1995 28-08-1996 30-07-1997 15-03-1996 22-04-1997 07-03-1996 09-03-1999



10/01/9954 #5

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/01972

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/01972 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: January 3, 2002

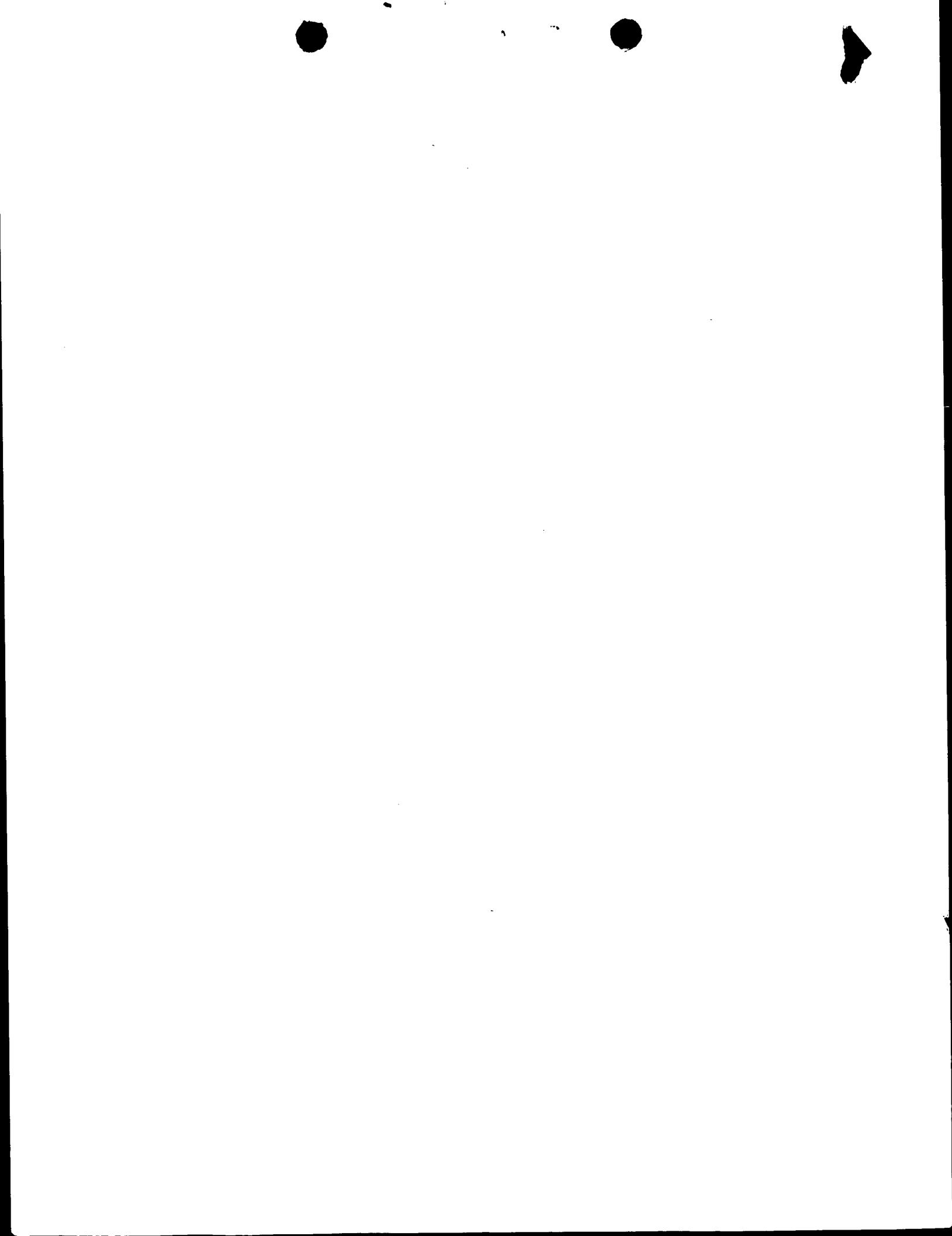
Signature of Director :



For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.



(19) World Intellectual Property Organization

WIPO

International Bureau

(43) International publication date

PCT

(10) International publication number

WO 01/04341 A1

(51) International patent classification⁷: C12P 19/18,
A61K 31/70

(21) International application number: PCT/FR00/01972

(22) International filing date: 7 July 2000 (07.07.2000)

(25) Language of filing: French

(26) Language of publication: French

(30) Data relating to the priority:
99/08,772 7 July 1999 (07.07.1999) FR

(71) Applicant (for all designated States except US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel
Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): SAMAIN, Eric
[FR/FR]; 5, allée du Charmant Som, F-38160 Gières
(FR). PRIEM, Bernard [FR/FR]; 5bis, rue Moyrand,
F-38100 Grenoble (FR).

(74) Representatives: MARTIN, Jean-Jacques etc.;
Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris
(FR).

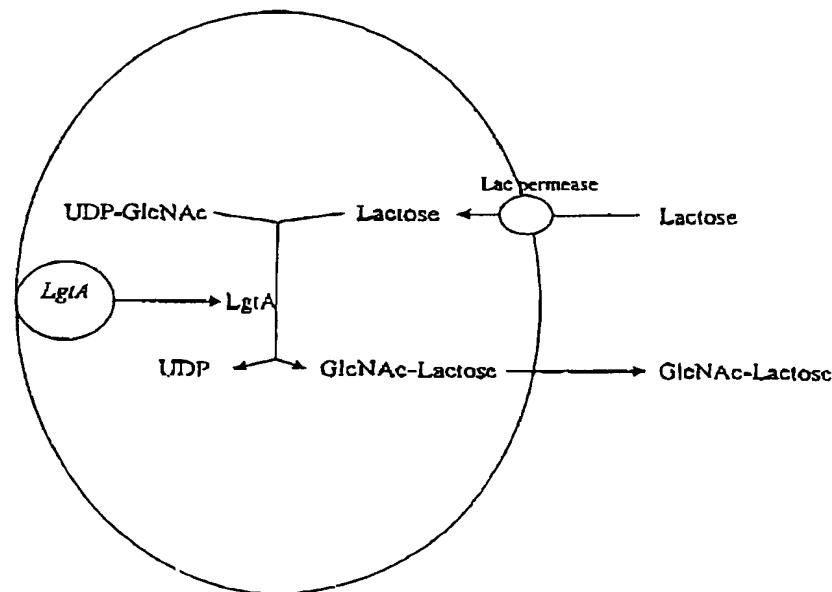
(81) Designated states (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW).

[continued on next page]

As printed

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING OLIGOPOLYSACCHARIDES

(54) Titre: PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES



WO 01/04341 A1

(57) Abstract: The invention concerns the production by microbiological process of oligopolysaccharides of biological interest. More particularly, the invention concerns a method for synthesizing *in vivo* oligopolysaccharides by internalization of an exogenous precursor in growing bacterial cells expressing adequate modifying and glycosylating genes.



(84) **Designated states (regional):** ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.

Published:

- With the International Search Report.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/18 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 35 994 A (PIEPERSBERG WOLFGANG PROF DR) 25 February 1999 (1999-02-25) claim 13; example 18	1-10,40
X	EP 0 392 556 A (MEITO SANGYO KK) 17 October 1990 (1990-10-17) abstract examples 1-4	1-3,6,8, 14,40
X	EP 0 315 496 A (SGN SOC GEN TECH NOUVELLE) 10 May 1989 (1989-05-10) the whole document	1,2,14, 40

Further documents are listed in the continuation of box C.

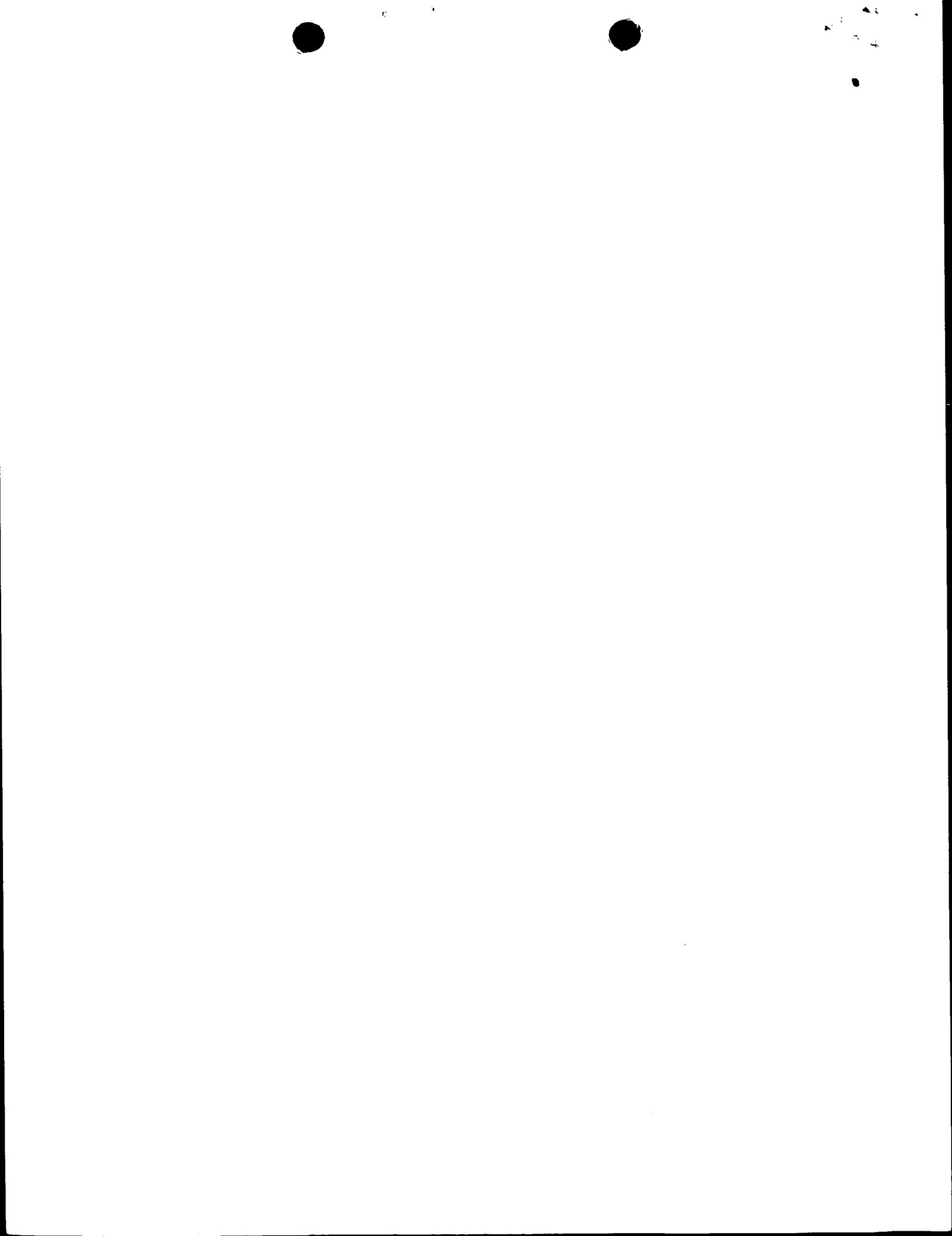
Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art, which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 November 2000	08/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lejeune, R

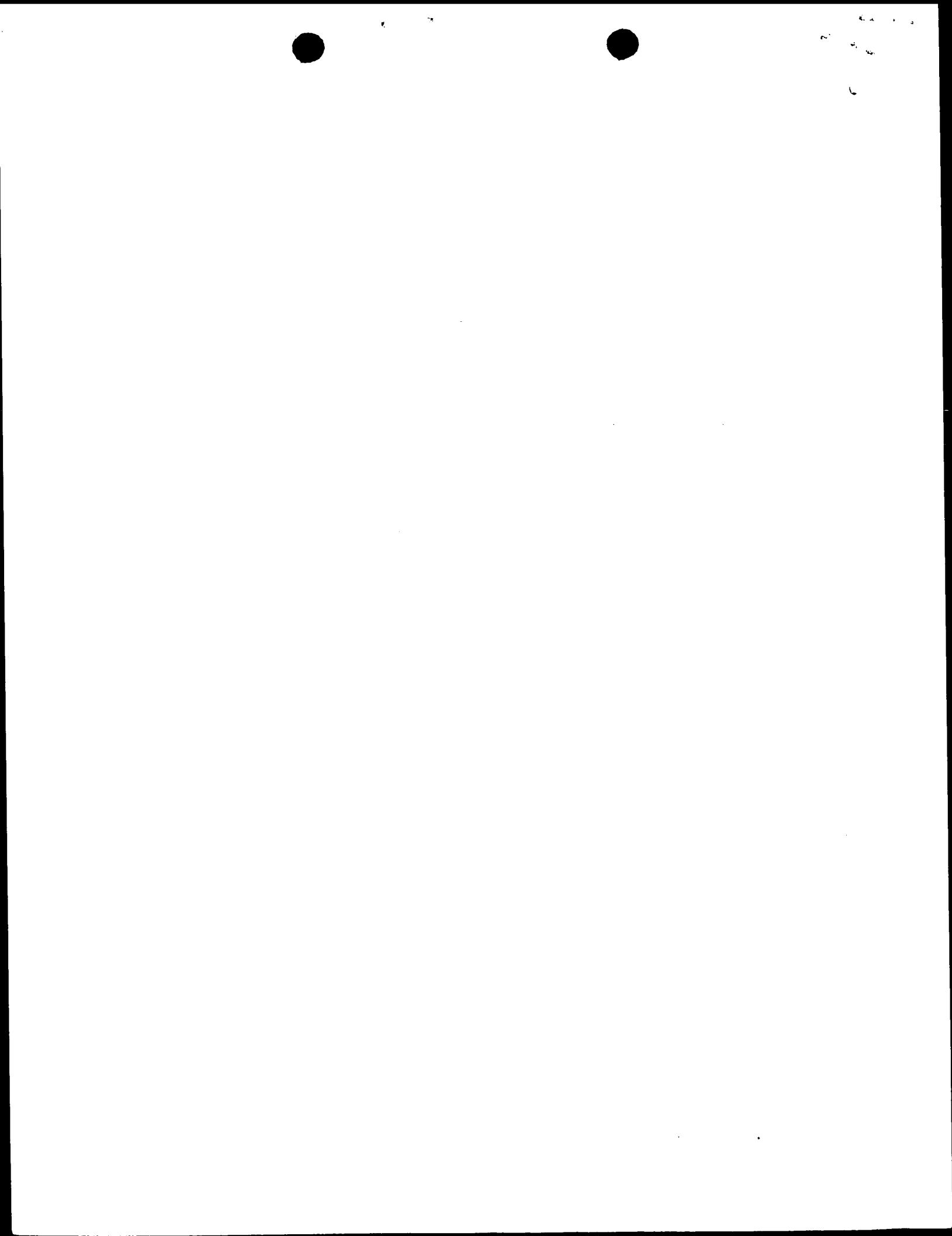


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01972

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BETTLER E ET AL: "The living factory: in vivo production of N-acetyllactosamine containing carbohydrates in <i>E. coli</i> " <i>GLYCOCOCONJUGATE JOURNAL</i> , vol. 16, March 1999 (1999-03), pages 205-212, XP002134857 CHAPMAN & HALL., GB ISSN: 0282-0080 the whole document	1-46
A	SAMAIN E ET AL: "Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant <i>Escherichia coli</i> strains harboring different combinations of nod genes" <i>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY</i> , NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 72, no. 1-2, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 33-47, XP004172885 ISSN: 0168-1656 the whole document	1-46
A	WO 98 44145 A (ABBOTT LAB) 8 October 1998 (1998-10-08) the whole document	1-3
A	WO 95 02683 A (NEOSE PHARM INC) 26 January 1995 (1995-01-26) abstract example 1	1-3
A	PLUMBRIDGE JACQUELINE ET AL: "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneurameric acid by <i>Escherichia coli</i> ." <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i> , vol. 181, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 47-54, XP000917021 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document	24,31-34



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/FR 00/01972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19735994 A	25-02-1999	WO EP	9909180 A 1005554 A	25-02-1999 07-06-2000
EP 0392556 A	17-10-1990	JP	2273192 A	07-11-1990
EP 0315496 A	10-05-1989	FR AT DE DE FI FR	2622598 A 94907 T 3884342 D 3884342 T 883076 A 2622598 B	05-05-1989 15-10-1993 28-10-1993 07-04-1994 30-04-1989 21-06-1991
WO 9844145 A	08-10-1998	US EP NO	5945314 A 0972068 A 994771 A	31-08-1999 19-01-2000 30-09-1999
WO 9502683 A	26-01-1995	AU AU CN EP FI JP NO US	691510 B 7329994 A 1129953 A 0785988 A 960173 A 9503905 T 960177 A 5879912 A	21-05-1998 13-02-1995 28-08-1996 30-07-1997 15-03-1996 22-04-1997 07-03-1996 09-03-1999

